



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**“INCIDENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN
AREAS CAÑERAS DE VERACRUZ Y SU INTERACCIÓN CON
EL BARRENADOR DE LA CAÑA DE AZÚCAR *Diatraea*
saccharalis”**

Pedro Fabián Grifaldo Alcántara

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2011

La presente tesis titulada: INCIDENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN ÁREAS CAÑERAS DE VERACRUZ Y SU INTERACCIÓN CON EL BARRENADOR DE LA CAÑA DE AZÚCAR *Diatraea saccharalis*. Realizada por el alumno: Grifaldo Alcántara Pedro Fabián, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dra. Alatorre Rosas, Raquel

ASESOR



Dr. Guzmán Franco, W. Ariel

ASESOR



Dr. Hernández Rosas, Francisco

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2011

“INCIDENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN AREAS CAÑERAS DE VERACRUZ Y SU INTERACCIÓN CON EL BARRENADOR DE LA CAÑA DE AZÚCAR *Diatraea saccharalis* ”

Biól. Grifaldo Alcántara, Pedro Fabián

COLEGIO DE POSTGRADUADOS 2011

RESUMEN

Nematodos entomopatógenos fueron colectados con el método de insectos cebo usando larvas de *Galleria mellonella*, en áreas de caña de azúcar en el municipio de Paso del Macho, Veracruz, México. Se obtuvieron tres aislamientos (MTB-P7-P9), los cuales fueron identificados como la misma especie por estudios morfológicos, morfométricos de las diferentes etapas de desarrollo, y por la caracterización filogenética y secuencias parciales de la región ITS del ADNr. El nematodo se encuentra taxonómicamente cercano a *Steinernema riobrave* y esta filogenéticamente relacionado con el grupo IV (*bicornutum-certaophorum-riobrave*), grupo caracterizado por la presencia de proyecciones “tipo cuernos” en la región de la cabeza de los juveniles infectivos (JI). *Steinernema* (MTB-P7-P9) se distingue de otras especies de Steinernemátidos, por presentar un carácter autopomórfico, forma de botella de la región anterior de primera y segunda generación de machos y hembras, en una proporción de 1:3 de la población. Sin embargo, la longitud del cuerpo de los juveniles infectivos $591.7\mu\text{m} \pm 37.2\mu\text{m}$ (532.6-692.4 μm) fue similar a *S*

riobrave, así como la fórmula de los campos laterales (2, 4, 5, 6, 8, 6, 5, 4, 2). Los machos de *Steinernema* (MTB-P7-P9), la longitud del cuerpo es $1753.4\mu\text{m} \pm 143.3$ (1585.9-2078.6 μm), con espículas amarillo doradas $68.6\mu\text{m} \pm 8,1$ (56,9-76.9 μm) de longitud con los variaciones en la cabeza de espículas. Estudios de virulencia basados en infectividad, penetración y eficiencia (mortalidad) de larvas de *Diatraea saccharalis*, plaga de la caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, mostraron que los tres aislamientos no presentaron diferencias entre ellos.

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes were collected with insect bait method using *Galleria mellonella* larvae in sugarcane areas in the municipality Paso del Macho, Veracruz, Mexico. Three isolates were obtained (MTB-P7-P9), which were identified as the same species by morphological, morphometric studies of different developmental stages, and by phylogenetic characterization and partial sequences of rDNA ITS region. The nematode is taxonomically close to *Steinernema riobrave*, and is phylogenetically related to group IV (*bicornutum-ceratophorum-riobrave*), a group characterized by the presence of projections "type horns" in the head region of the infective juveniles (JI). *Steinernema* (MTB-P7-P9) is distinguished from other Steinernematid species, because presents an autopomorphic character, a shaped bottle of the anterior region of first and second generation males and females, in a 1:3 ratio of the population. However, the body length of infective juveniles

591.7 $\mu\text{m} \pm 37.2\mu\text{m}$ (532.6-692.4 μm) was similar to *S. riobrave*, as the formula for the lateral fields (2, 4, 5, 6, 8, 6, 5, 4, 2). *Steinernema* (MTB-P7-P9) males, body length are 1753.4 $\mu\text{m} \pm 143.3$ (1585.9-2078.6 μm), with golden yellow spicules 68.6 $\mu\text{m} \pm 8.1$ (56.9-76.9 μm) in length with changes in the spicule head. Virulence studies based on their infectivity, penetration and efficacy (mortality) of the *Diatraea saccharalis* larvae, pests of sugar cane, *Saccharum officinarum*, showed that all three isolates did not differ between them.

DEDICATORIA

A tí, quien haz estado conmigo, compartiendo mis pequeños logros, mis sueños, por siempre vivir en la parte más cálida de mi corazón; por ser la caricia más maravillosa de mi vida, mi amor transparente. Tú, mi compañera, mi esposa, esa voz interna que me da fuerza para levantarme y seguir: gracias Tania.

A mis dos fortalezas Joel Grifaldo y Ruth Alcántara; gracias padre por enseñarme a luchar, esforzarme cada día, por enseñarme a mirar atrás y seguir adelante; y gracias a tí madre por también enseñarme a luchar con el alma, tal como tu siempre lo haz hecho; a amar las cosas que uno hace, gracias, por regalarme un pedacito de tu tierno corazón, mi mayor virtud.

A mis hermanos: Mary, Silvia, Ines, Joel, Héctor. Gracias por su apoyo, por toda una vida de sonrisas, de amor, de confianza, y de haber tenido una infancia y madurez perfecta a su lado. Por ello agradezco a Dios el haber tenido la suerte y orgullo de tenerlos como mis hermanos, los quiero mucho.

A mis cuñados y cuñadas, así como a mis sobrinos quienes ya forman parte de este eslabon que conforma mi amada familia.

A mis suegros Irene Lezama y Fransisco Arellano, de quienes recibí apoyo y ayuda incondicional cuándo más se necesitaba, muchas gracias también por permitirme ser parte de su linda familia.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos Miguel Angel (+), Jorge Hernández, Guadalupe Carrillo, Nicolás G. Martínez, Víctor H. Pérez, Víctor Perea, Jhony Navat, Gabriela Hernández, Santo Morales, Erika Muñiz, Karolina Pérez, Rafael Hernández, Lidia Juan; muchas gracias por su voz de aliento, su permanente ayuda, por su amistad invaluable; mas aún, gracias por ser el mar y la ola más grande y permanente de esta amistad.

A la Dra. Raquel por haberme transmitido sus amplios conocimientos, por su paciencia, su constancia; por haber estado conmigo desde el principio hasta el final de esta tesis, gracias por hacer y buscar la manera que este trabajo fuera cada vez mejor.

Al Dr. Ariel por su tiempo y esfuerzo dedicado a la elaboración de la tesis y las sugerencias realizadas. Muchas gracias Dr. Francisco por la ayuda que me brindó cuando más la necesitaba, creo que sin ello no hubiera podido seguir y poder finalizar.

A la Dra. Obdulia, por tantas horas robadas de su tiempo, por los días dedicados a mi tesis, sus palabras de aliento, su apoyo incondicional y por su amistad brindada.

Al Maestro Jorge Valdez por su amistad, tiempo y ayuda para la realización, procesamiento y toma de las fotografías.

A La Unidad de Microscopía de Electrónica, quien me apoyó para la toma de fotografías de barrido, y a Greta Hanako Rosas Saito, por brindarme todo el tiempo necesario para la realización y calidad de éstas.

A la Fundación Produce Veracruz, Proyecto: Tecnología sustentable para la producción de caña de azúcar (FPV/PROY/IENAD/10/06) y a la LPI: 5, Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal (BIOTECMIVA).

Al CONACyT, gracias por la beca otorgada, la cual me ayudó a concluir mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados por haberme brindado la oportunidad de poder continuar con mi formación profesional.

*Al CYMMYT y en especial al Dr. George Mahuku, por el apoyo proporcionado para la obtención de las larvas de *Diatraea saccharalis* utilizadas para esta investigación.*

Gracias Dios por tu iluminado silencio:

por levantarme de entre tus pies

por recogerme del suelo,

de la sombra que algunas veces pisas.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	xvi
GLOSARIO	xxii
ABREVIATURAS	xxv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPITULO 1. ANTECEDENTES	5
1.1. BARRENADOR DE CAÑA DE AZÚCAR <i>Diatraea spp.</i>	5
1.1.2. BIOLOGÍA, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	5
1.1.3. DAÑOS EN LA CAÑA DE AZÚCAR Y OTRAS GRAMÍNEAS	7
1.2. CONTROL BIOLÓGICO	8
	x

2.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA:	29
2.3.1. MICROSCOPIA DE LUZ: PREPARACIÓN DE ESPECIMENES	29
2.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	31
2.3.3. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE AISLADOS	32
2.3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
2.3.4.1. DESCRIPCIÓN DEL AISLADO Mata-Borrego MTB	33
2.3.4.1.1 MACHOS PRIMERA GENERACIÓN	33
2.3.4.1.2 MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN	38
2.3.4.1.3 HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN	38
2.3.4.1.4 HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN	39
2.3.4.1.5 JUVENILES INFECTIVOS	39
2.3.4.2 DESCRIPCIÓN DEL AISLADO Comalcoahuitl P9	42
2.3.4.2.1 MACHOS PRIMERA GENERACIÓN	42
2.3.4.2.2 MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN	42
2.3.4.2.3 HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN	42
2.3.4.2.4 HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN	43

2.3.4.2.5 JUVENILES INFECTIVOS	46
2.3.4.3 DESCRIPCIÓN DEL AISLADO Comalcoahuatl P7	47
2.3.4.3.1 MACHOS PRIMERA GENERACIÓN	47
2.3.4.3.2 MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN	47
2.3.4.3.3 HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN	47
2.3.4.3.4 HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN	48
2.3.4.3.5 JUVENILES INFECTIVOS	52
2.4. DIAGNOSIS Y RELACIÓN CON OTROS AISLADOS	56
2.5. LITERATURA CITADA	62
CAPITULO 3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS DE DOS ÁREAS CAÑERAS, EN VERACRUZ, MÉXICO	68
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS	69
3.2. DETERMINACIÓN MOLECULAR	69
3.2.1 EXTRACCION DE DNA Y AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS	69
3.2.2. ANALISIS FILOGENÉTICO	70

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
3.4. LITERATURA CITADA	79
CAPITULO 4. ESTUDIOS DE INFECTIVIDAD Y VIRULENCIA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (MTB, P7 Y P9)	83
4.1. MATERIALES Y MÉTODOS	84
4.1.1. NEMATODOS	84
4.1.2. INSECTOS	84
4.1.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS	85
4.1.3.1. VIRULENCIA	85
4.1.3.2. TIEMPO DE EXPOSICIÓN	86
4.1.3.3. CAPACIDAD DE PENETRACIÓN	87
4.1.3.4 EFICIENCIA DE USO DEL HOSPEDERO	87
4.2. RESULTADOS	88
4.2.1. VIRULENCIA	88
4.2.2. TIEMPO DE EXPOSICIÓN	89

4.2.3. CAPACIDAD DE PENETRACIÓN	91
4.2.4. EFICIENCIA DEL USO DEL HOSPEDERO	91
4.3. DISCUSIÓN	92
4.4. LITERATURA CITADA	96
5.0. CONCLUSIÓN GENERAL	100

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

- Figura 1. Microscopia electrónica de barrido primera generación *Steinernema* sp. A-B, cola de machos mostrando la distribución de papilas genitales, v= papila ventral. C, región cefálica mostrando el estoma del macho y la hembra, a= anfidios, (E); 6 papilas labiales, 4 cefálicas y 2 anfidios. D, región anterior del macho mostrando el poro excretor. F, vulva ubicada en la porción media ventral del cuerpo. 35
- Figura 2. *Steinernema* sp. primera generación, microscopia de luz; A-B región cefálica de machos, y D-E región cefálica de la hembra mostrando la terminación en forma de botella (A-D) y normal. C, espículas terminadas en punta. F, cola de la hembra con proyección tipo mucrón. G, hembra gigante primera generación. H, macho con posición en forma de J al morir. I-J, juvenil infectivo, región cefálica tipo corona. 36
- Figura 3. Espículas y gubernáculum de primera generación de machos. A-B, espículas terminadas en punta y con presencia de velum. C-D, vista dorsal y frontal del gubernáculum. 37
- Figura 4. Juveniles infectivos. A, región anterior mostrando la presencia de proyecciones tipo cuernos. A-D, disposición y división de campos laterales (2, 4, 5, 8, 7, 6, 5, 4, 2) en JI. C, fasmidio (F) localizado después del ano (An). D, terminación de la cola en forma de punta. 41

- Figura 5. *Steinernema* sp. Primera generación. A, región anterior con 44
terminación en forma de botella. B, papilas genitales; 12 pares de
papilas pareadas y una papila independiente. C-D, vista anterior
mostrando un anillo oral, 6 papilas labiales y 4 cefálicas de machos
(C) y hembras (D). E-F, vista lateral de la espícula y vista frontal del
cuneus en forma de aguja.
- Figura 6. *Steinernema* sp. A-B, primera generación de machos. B, región 45
cefálica en forma de botella y normal (A-E). D, parte posterior del
macho donde se muestran las espículas y el gubernáculo. E, región
anterior y F, región posterior de hembras de primera generación. G y
H, hembras de primera y segunda generación. I y J, juvenil infectivo
y región anterior.
- Figura 7. Campos laterales de juveniles infectivos *Steinernema* sp. A, región 46
anterior mostrando estructuras tipo cuernos, con un campo lateral
anterior y dos posteriores. B, campos laterales mostrando las
divisiones de cuatro a seis. C, Ocho campos laterales. D, reducción de
campos laterales (2, 4, 5, 8, 7, 6, 5, 4, 2), ubicación de fasmidio (F),
ano (An) y la terminación de la cola en punta.
- Figura 8. *Steinernema* sp. A, región anterior de machos con terminación en 49
forma de botella y B, machos con región cefálica normal. C-D,
papilas cefálicas y labiales de hembras de primera generación. E-F,
disposición de papilas caudales y espículas (SpL) pareadas y con

terminación en punta.

- Figura 9. *Steinernema* sp. microscopia de luz; A región cefálica de machos, B y 50
C macho con posición de J al morir; D espículas terminadas en
punta; E región cefálica de la hembra mostrando la terminación en
forma de botella y (F) normal; G hembra gigante primera generación;
H juvenil infectivo; I juvenil infectivo con región cefálica tipo corona
y cola en punta (J).
- Figura 10. *Steinernema* sp. Espículas de machos de primera generación, 51
mostrando la variabilidad de formas de las cabezas de las espículas,
así como la presencia de velum.
- Figura 11. *Steinernema* sp. juveniles infectivos. A, región cefálica con 52
proyecciones tipo cuernos. B-C y D, disposición de campos laterales
(2, 4, 5, 6, 8, 6, 5,4, 2). E-F, se muestra el fasmidio ubicado después
del ano, así como la terminación en punta.
- Figura 12. *Steinernema* sp. dibujos en microscopia de campo claro. A-B, 53
machos de primera generación con terminación en forma de botella
(A) y normal (B). C, parte posterior de machos de primera generación
y espículas y gubernáculum (D). E, hembras con terminación normal
y terminación con forma de botella (F) de primera generación. G,
región posterior de las hembras de primera generación con
terminación en mucrón. H, vulva de la hembra en vista dorsal. I,

juveniles infectivos con proyecciones tipo cuernos y, terminación de la cola en punta (J).

- Figura 13. Dendograma construido con las secuencias de la región ITS (ITS1- 75
5.8S-ITS2 de rDNA), con base en el método de Neighbor-Joining. Los números en cada rama del dendograma representan los valores “bootstrap”. El dendograma está realizado a escala con el largo de ramas es igual a la distancia evolutiva. Las distancias evolutivas se realizaron con el método de Tamura-Nei y están en base al número de sustituciones por sitio. Todas las posiciones que contienen espacios en el alineamiento o datos perdidos fueron eliminadas.
- Figura 14. Historia evolutiva inferida con Máxima Parsimonia de la región del 77
gen 5.8S del grupo IV de género *Steinernema*. El árbol corresponde árbol de consenso con el 50% de probabilidad de 39 árboles posibles. La reconstrucción del árbol se realizó con el algoritmo de Close-Neighbor-Interchange con adición de secuencias al azar con 10 repeticiones. Los sitios con espacios o datos perdidos fueron eliminados. El análisis se realizó con 157 de los cuales 14 fueron informativos para parsimonia, el análisis se realizó en MEGA4.
- Figura 15. Proporción de larvas de *Diatraea saccharalis* infectadas por cada uno 90
de los aislamientos a diferentes tiempos de exposición. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95% transformado de la escala logística.

Figura 16.	Proporción de JI de cada aislamiento que penetraron en larvas de <i>D. saccharalis</i> . Las barras de error representan intervalos de confianza al 95% transformado de la escala logística.	91
Figura 17.	Cantidad promedio de JI producidos por cada aislamiento por larva. Las barras de error representan $\pm 1X$ EEM (Error Estándar de la Media) (gl = 69).	92
Cuadro 1.	Morfometría de machos y hembras de primera generación y juveniles infectivos de los tres aislamientos de <i>Steinernema</i> sp.	54
Cuadro 2.	Morfometría de machos y hembras de segunda generación de los tres aislamientos de <i>Steinernema</i> sp.	55
Cuadro 3.	Características morfométricas comparativas de juveniles infectivos, machos y hembras de cinco especies afines a <i>Steinernema</i> sp.	59
Cuadro 4.	Morfométrica de diferentes estadios de <i>Steinernema</i> sp. agrupando los tres aislamientos encontrados (MTB+P9+P7).	61
Cuadro 5.	Comparación entre nucleótidos de los tres aislados de <i>Steinernema</i> sp. (P9, P7 y MTB), señalando que no hay variabilidad entre ellos.	73
Cuadro 6.	Matriz de la estimación de divergencias evolutivas de 12 especies de <i>Steinernema</i> basados en el análisis de los ITS r ADN. La diferencia en el número de bases entre secuencias es señalada. Todas las posiciones que contienen espacios o datos perdidos fueron	76

eliminadas, el total de sitios analizado fue de 596 posiciones en el programa MEGA 4.

- Cuadro 7. Posición de los nucleótidos de la región conservada (5.8S) 77
Steinernema sp. (P9, P7 y MTB) y la variabilidad encontrada de nucleótidos de otras especies del género *Steinernema* pertenecientes al grupo IV propuesto por Spiridonov *et al.*, (2004).
- Cuadro 8. Aislamientos de *Steinernema* sp. mostrando la LC₅₀, los límites 89 inferiores y superiores, la ordenada al origen y pendiente.

GLOSARIO

Anfidio: Órganos sensitivos situados lateralmente en la región anterior.

Anhidrobiosis: Estado de suspensión temporal de las actividades vitales que permite a un organismo resistir una larga desecación.

Anillo nervioso: Forma parte del sistema nervioso y se encuentra rodeando al esófago, justo arriba del bulbo basal.

Bulbo basal: Parte muscular del esófago que se encarga de la succión de los alimentos para llevarlos al intestino.

Calomus: Estructura en forma de cuello en las espículas.

Campo lateral: Ornamentaciones heterogéneas que se presentan en los juveniles infectivos (JI), las cuales presentan algunas incisuras a lo largo del cuerpo, sirviendo además como carácter taxonómico.

Qheilorhabdion: Pared de la cavidad labial del estoma o cheliostoma, delimitada anteriormente por la abertura oral y posteriormente por el protostoma (región posterior de la cavidad labial).

Juvenil Infectivo (JI): Estadio larval encargado de buscar al huésped y que está envuelto en el J3 y presenta grandes cantidades de reserva de energía.

Espícula: Órganos genitales accesorios de penetración ubicada en el extremo de la cola del macho que desembocan en el ano. Usualmente pareadas, quitinizadas.

Estoma: Se refiere a la boca o capsula oral.

Fasmidios: Órganos sensoriales pareados, quimiorreceptores, ubicados en la parte posterior, caudal.

Gonadas anfidelicas: Presencia de dos ovarios, generalmente uno extendiéndose anteriormente y el otro posterior a la vulva.

Gubernáculo: Se encargan de guiar a las espículas, para ayudar en la copulación.

Istmo: Región angosta que forma parte del esófago, ubicado entre el metacorpus o bulbo medio y el postcorpus o bulbo basal.

Intestino: Realiza la absorción de nutrientes, almacena energía y hace la excreción de residuos.

Lámina: Forma parte de las espículas y presentan dos salientes en forma de costillas.

Manubrio: Cabeza de las espículas.

Metacorpus: Forma parte del corpus ubicado entre el procorpus y el postcorpus; también se le conoce como bulbo medio.

Monorquido: Significa que sólo presenta un testículo reflejado.

Papilas genitales: Ornamentaciones ubicadas en la parte posterior, cuyo número y posición es considerado como carácter taxonómico.

Patógeno: Es un organismo que produce enfermedad, deformación o incluso la muerte de su hospedero.

Poros excretor: Forma parte del sistema excretor ó básicamente osmoregulador (hidratación-deshidratación).

Procorpus: Primera sección del esófago que se ubica en el corpus y que se encuentra también antes del bulbo medio.

Septicemia: Infección en la hemolinfa causada por la invasión y multiplicación de bacterias que puede causar la muerte en el insecto.

Simbiosis: Relación estrecha y benéfica entre organismos de diferentes especies. A los organismos involucrados se les denomina simbiote.

Velum: Estructura presente o ausente en machos, hialina/transparente que parte del calomus y suele terminar o no en la punta de la espícula.

ABREVIATURAS

Jl: Juveniles Infecciosos

NEP: Nematodos entomopatógenos

CL₅₀: Concentración letal cincuenta

TL₅₀: Tiempo letal cincuenta

n: número de individuos medidos

TBL: Longitud del cuerpo (por sus siglas en ingles)

MBW: anchura máxima del cuerpo (por sus siglas en ingles)

EP: Distancia de la región anterior al poro excretor (por sus siglas en ingles)

NR: Distancia de la región anterior al anillo nervioso (por sus siglas en ingles)

ES: Longitud del esófago (por sus siglas en ingles)

TL: Longitud de la cola (por sus siglas en ingles)

ABW: Diámetro del cuerpo a la región anterior

SpL: Longitud de la espícula (por sus siglas en ingles)

GuL: Longitud del gubernáculo (por sus siglas en ingles)

FL: Número de costillas del campo lateral (por sus siglas en ingles)

P: Poro excretor

An: Ano

F: Fasmidio

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) se ve afectado en su rendimiento por una diversidad de problemas fitosanitarios; entre estos destacan los daños ocasionados por el salivazo, *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) y los insectos barrenadores del género *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Pyralidae), cuyo impacto radica en su amplia distribución a lo largo del continente Americano (Ramón, 2002). *D. saccharalis*, *D. grandiosella* y *D. considerata* (Heinrich) son consideradas como plagas importantes en México, además de *Eoreuma loftini* (Dyar) que ha llegado a causar índices de infestación de entre 30 - 35% en los cultivos de caña de azúcar y maíz a nivel nacional (James, 2004; Rodríguez-del-Bosque & Smith 1995). Hernández *et al.*, (2007) mencionan en aéreas cañeras de Córdoba Veracruz la presencia de otras especies de insectos barrenadores, como *D. veracruzana* e incluso de otros géneros como *Elasmopalpus hunteri* (Zeller) y *E. loftini* (Dyar). Este último, denominado barrenador del arroz, constituye una fuerte amenaza debido a que puede llegar a desplazar a *D. saccharalis* (F) convirtiéndose en una plaga primaria (Legaspi *et al.*, 1997; Legaspi *et al.* 2000). Las larvas del barrenador de la caña de azúcar se alimentan de los tejidos de la planta hospedante haciendo túneles en su tallo y a veces perforando sus cogollos tiernos antes de transformarse en pupa, prolongando el túnel hasta la superficie del tallo donde dejan un orificio en la corteza para facilitar la salida del adulto (Ramón, 2002; Flores, 1994).

Además de los parasitoides y depredadores, los microorganismos entomopatógenos, y en particular los nematodos entomopatógenos (NEP) han sido empleados de manera exitosa en sistemas agrícolas, contra plagas del suelo, en habitats críticos y sobre follaje (Begley,

1990). Los NEP presentan similitud con los parasitoides y patógenos, ya que tienen quimiorreceptores y son móviles, característica que les permite buscar a su hospedante como los parasitoides. La rápida muerte del hospedante, es debido a la penetración del nematodo infectivo y la liberación de la bacteria mutualística *Xenorhabdus spp.* o *Photorhabdus spp.*, asociadas a los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* respectivamente, que permiten caracterizarlos como patógenos; y además tienen la ventaja de ser propagados *in vivo* o *in vitro* (Ehlers, 2002). El suelo es el reservorio natural de los NEP (Akhurst, 1986) ofreciendo condiciones para su supervivencia y actividad. La oportunidad para usar los NEP es muy promisorio ya que más del 90% de los insectos viven parte de su vida en el suelo (Gaugler, 1988).

La interacción entre *D. saccharalis* y nematodos entomopatógenos ha sido documentado (Molina, 2007). Incluso se reporta la presencia de nematodos infectando larvas del barrenador en ingenios localizados en Córdoba, Ver. (Hernández-Rosas *et al.*, 2007). El descubrimiento de *Steinernema riobrave*, agente nativo aclimatado a condiciones tropicales y semitropicales (Cabanillas *et al.*, 1994), con capacidad para parasitar insectos presentes tanto en el tallo como en el suelo, sugiere su alto potencial como agente de control biológico. Resultados de laboratorio muestran que el barrenador del arroz es altamente susceptible a *S. riobrave*. Spaul (1990) demostró que *Heterorhabditis* sp., (Nematoda: Rhabditidae) ocasiona el 40% de mortalidad del barrenador de la caña, *Eldana saccharina* cuando es aplicado sobre el cultivo a una dosis de 11000 millones de JI en 7400L de agua/ha. La mortalidad se incrementa cuando las aplicaciones se realizan por la tarde y se mantiene una humedad relativa alta (86-95%), lo que sugiere que existe un enorme

potencial para el manejo de estos insectos plaga, mediante el uso de nematodos entomopatógenos.

En la presente investigación se reportan los resultados de la colecta y caracterización morfológica y morfométrica de nematodos obtenidos de comunidades cañeras de la zona de abastecimiento del Ingenio Central Progreso, ubicado en el Municipio Paso del Macho, Veracruz, así como la determinación taxonómica molecular de los nematodos entomopatógenos. Se incluyen resultados de virulencia en laboratorio contra *D. saccharalis*. El trabajo es una contribución, en donde se analiza la actividad de los nematodos como patógenos del barrenador del tallo de la caña de azúcar.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los nematodos entomopatógenos asociados a barrenadores presentes en el cultivo de caña de azúcar en la zona de abastecimiento del Ingenio Central Progreso, Paso del Macho, Ver.; y determinar su patogenicidad hacia el barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Colectar muestras de suelo de la zona cañera de Paso del Macho, Ver.; para el trapeo de nematodos entomopatógenos con larvas de *Galleria mellonella* en busca de nematodos.
- Identificar y caracterizar a nivel de género y especie los nematodos aislados, utilizando técnicas de microscopía de luz, electrónica de barrido y de biología moleculares.
- Realizar ensayos que permitan determinar la capacidad de penetración, virulencia, uso eficiente del hospedero de aislamientos seleccionados de nematodos entomopatógenos, contra el barrenador de la caña de azúcar, *D. saccharalis*.

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

1.1. BARRENADOR DE LA CAÑA DE AZÚCAR *Diatraea spp.*

EL gusano barrenador (*D. saccharalis*, *D. considerata* y *Eoreuma loftini*) son considerados como las principales plagas insectiles de la caña de azúcar. En México y en otros países en donde el cultivo de caña de azúcar ocupa un lugar primordial, estas plagas han afectado gravemente a la industria azucarera, lo que provoca un fuerte impacto en la economía. Originalmente sus hospederos eran las gramíneas y los pastos forrajeros, pero poco a poco se han ido adaptando a la caña, de tal forma que ahora sus daños se reconocen desde Luisiana, EUA, hasta Tucumán, Argentina, en el continente Americano (Flores, 1994). *D. saccharalis*, *D. considerata* y *E. loftini* se reportan en ingenios de Sinaloa y Tamaulipas, atacando los canutos tiernos en las primeras etapas de desarrollo vegetativo de la caña de azúcar, con niveles de infestación que van desde el 12 al 30% en los Municipios como Ahome, Culiacán y Navolato, con pérdidas económicas por un monto de \$326,400.00 durante el ciclo agrícola 2004-2005 (CESAVESIM, 2009). Para contrarrestar los daños ocasionados por el barrenador, se han utilizado diversos métodos de control (químico, biológico, variedades resistentes) pero hasta el momento no se ha podido regular esta plaga a niveles tolerables (Flores, 1994).

1.1.2. BIOLOGÍA, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El barrenador aparentemente fue introducido en Luisiana en el año 1855, y rápidamente se expandió en los estados de la costa del Golfo, habita sólo en las porciones cálidas de estos

estados. El barrenador de la caña de azúcar también se encuentra en el Caribe, Centro América y América del Sur (Capinera, 2001), Rodríguez-Del-Bosque y Smith Jr. (1997) presentan a México como un país con una gran diversidad de especies de barrenadores del tallo asociados a cultivos de maíz y caña de azúcar. *Diatraea grandiosella* Dyar, es la principal plaga de maíz del Oeste y el centro de México en los estados de Chihuahua, Sinaloa, Jalisco, Colima, Puebla, Morelos, Michoacán y Veracruz. *D. lineolata* (Walker), ataca exclusivamente maíz y rara vez ha sido reportado en caña de azúcar. Este barrenador se distribuye en el Suroeste y el Este de los estados de Yucatán, Campeche, Tabasco, Veracruz, Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí, Guerrero, Oaxaca, Morelos y Puebla; encontrándose también en el Sur de Texas, Estados Unidos. *D. muellerella* Dyar y Heinrich, tiene una limitada distribución en la parte Sur del centro de México, en Morelos y Guerrero atacando maíz y muy rara vez reportado atacando caña de azúcar. *D. saccharalis*, es la especie más ampliamente distribuida de *Diatraea* en el Neotrópico, está presente en el Sureste de Estados Unidos, México, las Antillas, Centro América y Sudamérica, donde ataca a más de 60 plantas hospederas incluyendo sorgo, maíz y caña de azúcar. En México se encuentra en el Sureste, Este y Centro de los estados de Puebla, Oaxaca, Guerrero, Chiapas, Tabasco, Yucatán, Campeche, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas y Nuevo León y la región Norte de Florida en los Estados Unidos. *D. considerata* Heinrich, constituye la especie más destructiva de todas las especies barrenadoras (Flores, 1994), y la que ocasiona los mayores daños en los ingenios de Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco y Michoacán. *D. magnifactella* Dyar, ocasionan daños tan importantes como *D. considerata* y *E. loftini*. Tiene una distribución en el Este, Centro y Sureste de los estados de Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Morelos, Puebla, Veracruz, Tabasco, Quintana

Roo, San Luis Potosí, y Tamaulipas atacando caña de azúcar y rara vez maíz. *Eoreuma loftini*, barrenador que ataca una amplia variedad de hospederos incluyendo maíz, sorgo, arroz y pastos, ocupa el segundo lugar considerando los daños que ocasiona a la caña. Se distribuye ampliamente en el Oeste y Suroeste de los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Oaxaca, Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí y Nuevo León; también se encuentra presente en California, Arizona y Texas, Estados Unidos (Mendivil, 1986, Flores, 1994; Legaspi *et al.*, 1997).

1.1.3. DAÑOS EN CAÑA DE AZÚCAR Y OTRAS GRAMÍNEAS

El barrenador del maíz, *D. grandiosella* causa pérdidas en maíz en las planicies de los estados del sur y del suroeste de los Estados Unidos, las cuales han sido estimadas en varios millones de dólares anuales (Morrison *et al.*, 1977). En el maíz, para ensilaje, hay pérdidas cuando el daño por la alimentación del barrenador del maíz reduce el vigor de las plantas hasta el punto de retrasar significativamente el crecimiento vegetativo, y las pérdidas en maíz dulce y de campo ocurren cuando se retrasa la producción de las mazorcas. El acame de las plantas maduras de maíz debido al anillado ocasionado por las larvas que se preparan para entrar en diapausa en la corona de la caña puede causar la pérdida de plantas completas que no pueden ser cosechadas (Chippendale & Sorensen, 1997).

La calidad y pureza del jugo al ser extraído de la caña es reducida cuando el barrenador está presente, y la cantidad de sacarosa en el campo puede ser reducida de 10 al 20%. *D. grandiosella* generalmente se le ha encontrado en el sur de Sonora, algunas veces incrementando sus poblaciones al grado de causar serios daños a las siembras de otoño. La

incidencia de esta plaga en sorgo es mucho menor que en maíz y con consecuencias de menor trascendencia, debido a que el sorgo es más bajo que el maíz y por tanto más resistente a doblarse o a quebrarse cuando está infestado. En el Valle del Yaqui, se evaluaron los daños del barrenador al maíz, encontrándose que este cultivo puede resistir bastante daño físico sin bajar los rendimientos (Mendivil, 1986).

Las pérdidas que ocasiona el barrenador de la caña de azúcar *D. saccharalis* en varios cultivos en Cuba arrojan cifras que indican que con cada 1% del incremento de la intensidad de la plaga se pierden 5.8Kg de azúcar por hectárea, lo que significa una disminución de 1.6% del rendimiento que producen las cañas sanas (Aday *et al.*, 2003).

1.2. CONTROL BIOLÓGICO

Las pérdidas ocasionadas por los insectos barrenadores se pueden reducir mediante el manejo integrado de plagas, principalmente utilizando enemigos naturales (parasitoides, depredadores y patógenos). Para ello se debe conocer la distribución y el nivel de daño ocasionado por la plaga. El estado de la plaga de una especie individual de un barrenador varía entre ecozonas, países y regiones. Algunas de las variaciones en la dinámica poblacional de los barrenadores entre regiones fue atribuida a la acción de los parasitoides (Kfir, 1995).

1.2.1. PARASITOIDES

Los parasitoides son los enemigos naturales más utilizados en programas de control biológico de plagas insectiles y su importancia radica en que se pueden reproducir

masivamente así como su facilidad de ser liberados en campo (Carballo, 2002). La abundancia de los diferentes parasitoides, que inciden en forma natural en las poblaciones del barrenador, varían con respecto a la fecha de colecta durante el año (Chávez y Vejar, 2004). Rodríguez-Del-Bosque y Smith Jr. (1997) elaboraron una lista de distintos parasitoides de barrenadores del tallo, en cultivos de maíz y caña de azúcar, que se encontraron en exploraciones realizadas en México y Estados Unidos, en los años 1926 a 1980's, donde se pueden agrupar a las distintas familias en parásitos de huevos: Scelionidae, Trichogrammatidae; parásitos de huevo-larva: Braconidae; parásitos de larvas: Braconidae, Eupelmidae, Ichneumonidae, Tachinidae; parásitos de larva-pupa: Chalcididae. *Apanteles deplanatus* (Hymenoptera: Braconidae) tienen una amplia distribución geográfica asociada a barrenadores del tallo en México, como *D. considerata* y *D. magnifactella*, siendo conocido primero en Nayarit y Jalisco en las costas del Sureste de México, y ahora expandiéndose a través del sur del centro de México hacia el Golfo de México que incluye los estados de Colima, Michoacán, Morelos, Puebla y Veracruz. Aunque la distribución del hospedero no se ajusta con este parasitoide, se cree que fue por la presencia de barreras naturales, aun así se considera como un enemigo potencial para barrenadores del tallo (Smith Jr. y Rodríguez-Del-Bosque, 1994). Uno de los parasitoides más exitosos en Venezuela es la mosca amazónica, (Diptera: Tachinidae) *Lydella mínense*, sin embargo por su especificidad hacia *D. saccharalis* limita su efectividad contra otras especies de barrenadores (Ramón *et al.*, 2002). Las liberaciones de (Diptera: Tachinidae) *Melagonystilum mínense* Myers y (Hymenoptera: Braconidae) *Cotesia flavipes* Cameron en cultivos de caña de azúcar durante el periodo de zafra en el centro de Venezuela durante 45 años, no tuvo un efecto evidente sobre la parasitación de *D. saccharalis*, sin embargo se

considera que el parasitismo de la mosca *M. mínense* tiene mayores posibilidades ya que es más eficiente en la búsqueda del barrenador y por ser un competidor más fuerte que *C. flavipes* (Weiler L. *et al.*, 2007). A pesar que *C. flavipes* parasita exitosamente a *D. saccharalis* (Wiedenman y Smith, 1995), los intentos por introducirlo contra *E. loftini* (Dyar), *D. grandiosella* y *D. lineolata* no han sido exitosos (Overholt y Smith, 1990; Wiedenman *et al.*, 2003).

A finales de la década de los 70's y principios de los 80's la industria de la caña de azúcar en la parte baja del Valle del Río Grande en Texas fue afectada dramáticamente por tres eventos; 1) La disminución de la importancia del barrenador de la caña de azúcar *D. saccharalis* que paso de ser una plaga clave a una de menor importancia; 2) la intensificación de la importancia del barrenador mexicano del arroz, *E. loftini* paso de ser una especie no reportada a ser una especie clave; y 3) el establecimiento de (Hymenóptera; Braconidae) *C. flavipes* Cameron como agente de control del barrenador de la caña de azúcar. Diferentes especies de parasitoides importados de varias partes del mundo se han liberado en el sur de Texas para el control del barrenador del arroz; sin embargo, muestreos recientes indican que los parasitoides dominantes en la región son dos especies indígenas de Texas: *Chelonus sonorensis* (Hymenoptera; Braconidae) y *Digonogastra solitaria* (Díptera: Braconidae). La mosca (Díptera: Tachinidae) *Lydella jalisco* Woodley, proveniente de México, ofrece en la actualidad la mejor oportunidad para el control biológico del barrenador del arroz por un parásito exótico, con alta capacidad de adaptación (Legaspi *et al.*, 1997). De igual manera, se considera que *Paratheresia claripalpis* (Diptera:Tachinidae) es sin duda el parasitoide más importante de los barrenadores, considerando su amplia distribución geográfica, la existencia de razas ecológicas que le

permiten una versatilidad para parasitar por lo menos 17 especies de barrenadores, en las más variadas condiciones ecológicas. Liberaciones de la mosca (Diptera:Tachinidae) *P. claripalpis* indican que esta ha iniciado su establecimiento en poblaciones de *D. considerata* y *D. grandiosella* en el ingenio de los Mochis, Sinaloa.

En Villa Clara, Cuba tras la liberación consecutiva de la mosca (Diptera:Tachinidae) *Lixophaga diatraea* Towns durante 14 años, lograron apreciar una disminución de *D. saccharalis* manteniéndola por abajo del umbral económico y así mismo recomendando la utilización de otro medio de control biológico que actué en combinación con *L. diatraea* (Aday *et al.*, 2003).

1.2.2. ENTOMOPATÓGENOS

El hábito críptico en la alimentación de las larvas del barrenador puede constituir una adaptación específica, que les permite evitar muchos de los enemigos naturales. Sin embargo la mortalidad natural, especialmente la provocada por los entomopatógenos, es raramente considerada al hacer recomendaciones de control en la mayoría de los agroecosistemas (Steinkraus, 2000). Para reducir la dependencia en los plaguicidas, hay que identificar otros métodos que sean económicos, ambientalmente seguros y cuya efectividad sea a largo plazo. El control con los patógenos de insectos constituyen una importante opción en el Manejo Integrado de los barrenadores.

Para tener un efecto directo sobre el insecto plaga, la introducción de los entomopatógenos debe impactar sobre la fase de desarrollo que se encuentra expuesta o migrando, y esta

varía dentro de las especies. Cada especie dispone para su tratamiento con una ventana de acción específica, el agricultor debe monitorear su cultivo y asegurar una cobertura y persistencia completa durante cada ventana de aplicación. Esto en turno, puede requerir más de una aplicación debido a la dilución por efecto del crecimiento e inactivación del patógeno en el campo. A pesar de que algunos entomopatógenos como *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tienen un amplio rango de hospederos, otros como baculovirus y en menor grado los microsporidios y algunos hongos, que tienen estrecho rango de hospedante, lo que indica la necesidad de utilizar diferentes agentes de control biológico para tratar a un complejo de especies plaga asociadas al cultivo.

Para que el control microbiano sea una opción favorable dentro del ecosistema este deberá proporcionar un buen control de la especie de barrenador clave, ser aplicado a bajo costo, y ser compatible con las prácticas existentes del hongo *Beauveria bassiana* y *Metarhizium* sp. (Estrada *et al.*, 2004; Cagan y Svercel, 2001; Hernández-Rosas *et al.*, 2009) o de los nematodos entomopatógenos, *Steinernema* spp, y *Heterorhabditis bacteriophora* (Cabanillas y Raulston, 1994; Sankaranarayanan, 2003; Molina *et al.*, 2007).

1.2.2.1. NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS; *Steinernema* y *Heterorhabditis*

El parasitismo por nematodos puede ocasionar esterilidad, reducción de fecundidad, reducción de la longevidad, de la actividad de vuelo y retraso del desarrollo en sus hospedantes, así como cambios en comportamiento o cambios morfológicos (Poinar, 1979). Los nematodos, *Steinernema* y *Heterorhabditis* tienen una relación simbiótica con una bacteria que les permite matar rápidamente a su hospedante (en 48-72 h) (Kaya & Stock,

1997, Soler *et al.*, 2003); la bacteria del género *Xenorhabdus* para Steinernematidae y *Photorhabdus* para Heterorhabditidae. Todos los nematodos entomopatógenos conocidos presentan una biología similar (Koppenhöfer, 2000), tienen un ciclo de vida que incluye huevo, juvenil y adulto. La fase del juvenil, en especial la tercera fase (J3) resalta, ya que a partir de esta, y dependiendo de las condiciones nutrimentales y existencia de espacio para su reproducción, dentro del hospedero, esta puede dar origen a una generación de J3 o transformarse en el juvenil infectivo (JI); esta forma es particularmente resistente a las condiciones ambientales, inclusive a ambiente extraordinariamente severos (McSorley, 2003). Los JI contienen células vivas de la bacteria mutualística, en su intestino y sirven para llevar a la bacteria de un hospedero a otro (Woodring y Kaya, 1988). Esta bacteria es transportada por el nematodo dentro del hemocele del hospedero induciendo una letal septicemia. Después de invadir la hemolinfa, los nematodos segregan proteasas que inhiben la actividad del sistema inmune del insecto y proporciona las condiciones iniciales para el desarrollo de la bacteria en su fase I, la cual promueve una rápida colonización de los órganos y tejidos del hospedero (Givaudan *et al.*, 1995), en consecuencia para el desdoblamiento de los nutrientes disponibles para el nematodo. La bacteria además, libera sustancias con actividad antibiótica que protegen al cadáver de la invasión de organismos oportunistas (Soler *et al.*, 2003).

1.2.2.2. IMPORTANCIA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS; *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. EN EL MANEJO DE INSECTOS BARENADORES

Los nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* y su bacteria asociada han sido exitosamente comercializados como agentes de control biológico dentro del manejo de plagas. Ellos pueden matar su hospedero rápidamente (24-48 h), son fáciles de aplicar, y están exentos de requerimientos de registro a nivel local y federal en muchos países debido a su seguridad contra mamíferos y plantas (Georgis *et al.*, 1991).

Los steinernematidos y heterorhabditidos difieren en comportamiento por su capacidad de búsqueda, tolerancia a parámetros ambientales, desplazamiento en el suelo y patogenicidad contra varias especies de insectos (Gaugler, 1988). Sin embargo existen barreras de comportamiento que restringen la eficacia contra un hospedero seleccionado o grupos de hospederos (Gaugler, 1988). Algunas especies buscan a su hospedero en o cerca de la superficie del suelo, se mantienen sedentarios esperando por su hospedero (*S. carpocapsae* o *S. scapterici*); otros están adaptados para buscar (nictitar) en el suelo, son muy móviles, y responden fuertemente a sustancias atrayentes del hospedero (*S. glaseri*, *S. riobrave*, *H. bacteriophora*) (Grewal *et al.*, 1994, Campbell y Gaugler 1993), lo que podría favorecer su adaptación en la búsqueda de hospederos sedentarios (Georgis *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 1993).

Entre los factores que influyen en la actividad de los NEP, la temperatura y la humedad son los más importantes, ya que estos afectan su movilidad, infectividad, desarrollo y reproducción (Kaya, 1990). El efecto de la temperatura sobre la actividad de los nematodos

varía con la especie y raza de nematodo (Kaya, 1990; Grewal *et al.*, 1994). Los JI generalmente son lentos a bajas temperaturas (< 10-15 °C) y también son inactivados a altas temperaturas (>30-40 °C). La mejor actividad de los nematodos comercialmente disponibles puede ser entre 20 y 30 °C. Excepciones son *S. feltiae* con una actividad eficaz entre 12 a 25 °C, y *S. riobrave* con excelente actividad entre 12 y 35 °C. Para la mayoría de las especies la temperatura optima se encuentra entre 5 y 15 °C (Georgis, 1990). Pruebas de laboratorio realizadas con el barrenador de la caña, *E. infuscatellus* Snellen mostraron que la temperatura es un factor determinante y diferentes especies de NEP a 27°C requieren menor tiempo para causar la muerte del barrenador. De igual manera la multiplicación de los nematodos en larvas infectadas del barrenador a 27°C fue mayor que a 18°C (Sankaranarayanan, 2003).

La humedad es uno de los factores importantes que influyen en la efectividad de los nematodos. Los JI requieren una película de humedad para poder moverse en el suelo y en habitat crípticos. Aplicaciones sobre el follaje y otros habitats expuestos, limita la sobrevivencia de los nematodos a horas, a menos que la HR se encuentre al 100%. Para retardar la desecación y prolongar la persistencia de los nematodos sobre el follaje, se recomienda agregar sustancias humectantes a la suspensión de nematodos (Koppenhofer, 2000).

1.2.2.3. ECOLOGIA Y COMPORTAMIENTO

Los nematodos entomopatógenos presentes en diferentes regiones geográficas proveen una oportunidad para comparar las adaptaciones (morfológicas, fisiológicas y de

comportamiento) de estos organismos al nicho ecológico en donde habitan junto con los insectos hospederos. Las diferencias en adaptaciones térmicas, por ejemplo, pueden resultar en la especialización tanto del hospedero como del nematodo parásito. (Grewal *et al*, 1994) mencionan que las especies de nematodos entomopatógenos que están adaptadas a temperaturas frías serán más efectivas parasitando y reproduciéndose en insectos que son más activos durante el invierno, mientras especies adaptadas a temperaturas cálidas pueden ser más efectivas durante el verano.

Es conveniente resaltar que el grado de infectividad de las especies o razas de nematodos entomopatógenos varía considerablemente de acuerdo al hospedante, y ninguna presenta en condiciones naturales un rango de hospederos amplio. Esto indica la importancia de buscar nuevos agentes biológicos adaptados a las condiciones donde se encuentra el insecto blanco, ya que el desarrollo, la maduración y la reproducción de los nematodos entomopatógenos está definido por condiciones térmicas (Grewal *et al*, 1994), textura del suelo, donde el tamaño de los poros, agua, aireación, temperatura; así como las plantas que se encuentran en la localidad afectan directa o indirectamente al nematodo (Wallace, 1963), al igual que los microorganismos tales como bacterias, hongos, macro y microorganismos que se encuentran en el suelo los que influyen en forma directa en la persistencia o disminución en la población de nematodos (Ishibashi y Kondo, 1986).

1.3. LITERATURA CITADA

Aday, D.; de la Osmany C., M Barroso., R. Franco e Izquierdo., N. Lázaro. 2003. Estimación de pérdidas causadas por *Diatraea saccharalis* (Fab.) en la provincia de Villa Clara, Cuba. Centro Agrícola, 30, 1.

Akhurst, R.J. 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*: its interaction with insect pathogenic nematodes. Systematic and Applied Microbiology 8, 142-147.

Doucet, M. M. y A. Giayetto. 1994. Gama de huéspedes y especificidad en *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Heterorhabditidae: Nematoda). Nematol Medit. 22: 171-178.

Begley, J.W., 1990. Efficacy against insects in habitats other than soil. Pp 215-321. En R. Gaugler and H.K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in biological control, Boca Raton, Fl.: CRC Press.

Burnell, Ann M. y S. Patricia Stock. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects. Nematology, 2:1, 31-42.

Cabanillas, H.E. y J.R. Raulston. 1994. Evaluation of the spatial pattern of *Steinernema riobraviss* in corn plots. Journal Nematology. 26: 5-31.

Cagán, L. y M. Svercel. 2001. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Central European Agriculture. 2: 3-4.

Campbell, J. F. y R. Gaugler. 1993. Nictation Behaviour and its ecological implications in the host search strategies of the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour* 126 (3-4): 155-169.

Campos-Herrera R., J. Jiménez & C. Guitiérrez. 2007. Tolerance of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) to agrochemical products. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 72:3.

Capinera, L. J. 2001. Sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida; EENY-217.

Carballo, Manuel. 2002. Manejo de insectos mediante parasitoides. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* No. 66, p. 118-122.

CESAVESIM, 2009. Campaña para el manejo fitosanitario de la caña de azúcar. <http://www.cesavesin.gob.mx/cms> Generado: 19 August, 2009, 15-16

Chávez Lugo P. y Guadalupe Vejar Cota. 2004. Parásitos naturales y establecidos del gusano barrenador de la caña de azúcar (Lepidoptera: Crambidae) en el norte de Sinaloa. *Memorias; XXVII Congreso Nacional de Control Biológico*. Los Mochis Sin. pp. 195-198.

Chippendale, G. Michael y Clyde E. Sorenson. 1997. Biología y manejo del barrenador del maíz del suroeste. En Radcliffe's el texto mundial del MIP. Universidad de Minnesota. pp 18-33

Ehlers, R.U. 2002. Nematodos entomopatógenos para el control de insectos. *Phytoma España* 144: 77-81.

Estrada, María Elena, M. Romero, M. J. Rivero y F. Barroso. 2004. Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba. *Revista Iberoamericana de Micología*; 21: 42-43.

Flores Cáceres S. 1994. Las plagas de la caña de azúcar en México. 1ª Ed. 337 pp.

Gaugler Randy y Boush Mallory, G. 1979. Non susceptibility of rats to the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae*. *Environmental Entomology*. 8: 4, 658-660.

Gaugler, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 24: 351-360.

Georgis 1991 y R. Gaugler. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*. 84: 713-720.

Georgis, R. Koppenhöfer, A. M., Lacey, L. A., Bélair, G., Duncan, L. W., Grewal, P. S., Samish, M., Tan, L., Torr, P. y van Tol R. W. H. M. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control*. 38:103-123.

Givaudan Alain, Baghdiguian Stephen, Lanois Anne y Boemare Noel. 1995. Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:4, 1408-1413.

Grewal S. Parwinder, Sen Selvan y Randy Gaugler. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal* 19: 4, 245-253.

Grewal, P. S, Lewis, E. E., Gaugler, R, y Campbell, J. F. 1994. Host finding behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 108: 207-2 15.

Hernández-Rosas, F., Ventura Benítez, N. I.; Pérez-Fernández, M. R. y N. Real Luna. 2007. Manejo sustentable del agroecosistema caña de azúcar: Caso barrenador del tallo en Paso del Macho, Veracruz. XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio del IOBC, Mérida, Yucatán.

Ishibashi, N., y E., Kondo. 1986. *Steinernema feltiae* (DD-136) y *S. glaseri*: persistence in soil and bark compost and their influence on native nematodes. *Journal of Nematology*. 18:3, 310-316

James Glyn. (Ed). 2004. Sugarcane. World Agricultural Series. Sugarcane. Secon edition. Blackwell Publ.

Kaya, H.K. 1990. Soil ecology. *En* R. Gaugler y H. K.Kaya, eds.Pp 93-115. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, Fl., CRC Press

Kaya K. H. & Stock P. S. 1997. Techniques in insect nematology. *En*: Lacey A. Lawrence. 1997. Manual of techniques in insect pathology. Elsevier science, San Diego California, USA. p. 281-324.

Kfir, R. 1995. Parasitoids of the African stem borer, *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae), in South Africa. Bulletin of Entomological Research. 85: 369-377.

Koppenhofer, M.A. 2000. Chapter IV-5. Nematodes. Pp. 283-301 En: L.A. Lacey and H.K. Kaya (eds.), Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Press.

Legaspi, J. C.; B. C. Legaspi, Jr., E. G. King, y R. Saldaña. 1997. Mexican rice borer, *Eoreuma loftini* (Lepidoptera: Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley of Texas: its history and control. Subtrop. Plant Sci. 49: 53-59.

Legaspi C. J., B. C. Legaspi Jr. y R. R. Saldaña. 2002. Evaluation of *Steinernema riobrave* (Nematoda: Steinernematidae) against the mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Entomological Science 35: 2.

Lewis, E E., R. Gaugler, , y R. Harrison, 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. Canadian Journal Zoology. 71:765-769.

McSorley, Robert. 2003. Adaptations of Nematodes to Enviromental Exremes. Florida Entomologist 86:2, 138-142.

Mendivil, P. 1986. Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California. Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste-CIANO. Cd. Obregón, Sonora, México. Pág 142-144.

Molina Acevedo, Juan P., R. Ian Samuels, I. Ribeiro Machado y C. Dolinski. 2007. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 96 :187-192.

Morrison, W. P., D. E. Mock, J. D. Stone, y J. Whitworth. 1977. A bibliography of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella* Dyar. *Bulletin. Entomological Society of America*. 23: 185-190.

Overholt, W. A. y J. W. Smith, Jr. 1990. Colonization of six exotic parasites (Hymenoptera) against *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Pyralidae) in corn. *Environmental Entomology*. 19: 1889–1902.

Pérez E. E. y E. E. Lewis. 2002. Use of entomopathogenic nematodes to suppress *Meloidogyne incognita* on greenhouse tomatoes. *Journal of Nematology*, 34 (2): 171-174.

Poinar Jr., R. 1979. *Nematodes for Biological Control of Insects*. Boca Raton, Florida. CRC Press

Ramón M., M. Pérez, C. Mendoza y F. Mauriello 2002. Reacción de 18 cultivares de caña de azúcar al ataque del taladrador de las caña de azúcar *Diatraea* spp. en el Estado Portuguesa, Venezuela. *Revista Facultad Agronomía*. 19: 210-218.

Ring R. Dennis y W., H Browning, 1990. Evaluation of entomopathogenic nematodes against the Mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Nematology*, 22 (3): 420-422.

Rodríguez-Del-Bosque L. A. y J. W. Smith Jr. 1997. Biological control of maize and sugarcane stem borers in México: A review. *Insect Science and its Application*. 17:3, 305-314.

Rodríguez-Del-Bosque L. A., Palomo-Salas, J. y A. Méndez-Rodríguez,. 1996. Susceptibility of bermudagrass cultivars to *Eoreuma loftini* (Lepidoptera: Pyralidae) in subtropical Mexico. *Florida Entomologist*, 79:2, 188-193.

Rodríguez-del-Bosque1 y J. W. Smith, Jr. 1995. Casos de hiperparasitismo en barrenadores del tallo, *Diatraea spp.*(Lepidóptera: Pyralidae), en México. *VEDALIA 2:41-42 (1995) Nota de Investigación. ISSN 1405-0420*

Sankaranarayanan, C., S. Easwaramoorthy y Nethi Somasekhar. 2003. Infectivity of Entomopathogenic Nematodes *Heterorhabditis* and *Steinernema spp.* to Sugarcane Shoot Borer (*Chilo infuscatellus* Snellen) at Different Temperatures. *Sugar Technology* 5: 3, 167 - 171

Smith Jr. W. J. y A. L. Rodríguez-Del-Bosque 1994. New distribution and host-range records for *Apanteles deplanatus* (Hymenoptera: Braconidae), a parasite of *Diatraea considerate* and *D. magnifactella* (Lepidoptera: Pyralidae), in Mexico. *Biological Control* 4, 249-253.

Soler M. Dulce, Lucila Gómez y Lourdes Sánchez. 2003. Formulación de nematodos entomopatógenos. *Revista. Protección Vegetal*. 18 :1.

Spaull, V.W. 1990. Field test to control the pyralid, *Eldana saccharina*, with an entomogenous nematode, *Heterorhabditis* sp. Proceedings of the South African Sugar Technologist Association, 64, 103-106.

Steinkrause C.D. 2000. Documentation of Naturally-Occurring Pathogens and Their Impact Agroecosystems. Chapter V-I. Pp 303-320. En L.A. Lacey and H.K. Kaya (eds). Field Manual Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Press Publishers.

T. de Freitas, Maria do Rosario, Ana Paula P. Da Fonseca, Edleide L. Da Silva, Adriana L. Mendonca, Carlos E. Da Silva, Alana L. Mendonca, Ruth R. Do Nascimento y Antonio Euzebio G. Sant´ana. 2006. The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the state of Alagoas, Brazil. Florida Entomologist, 89:4, 539-540.

Valverde Luis, A., F. Badilla y G. Fuentes. 1991. Perdidas de azúcar a nivel de fábrica causadas por *Diatraea tabernella* en tres variedades de caña de azúcar (*Saccharums pp.*) en la zona alta de San Carlos, Costa Rica. Agronomía Costarricense. 15(1/2): 7-12.

Wallace, H. R. 1963. The Biology of Plant Parasitic Nematodes. Edward Arnold Ltd., London. Pp 9-11. En: Gaugler R. y Kaya, H. K. 1990. Entomopathogenic nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL. USA. ISBN 0-8493-4541-3.

Weir L. Henrique H., W. Contreras & K. Gil de Weir. 2007. Biological control of *Diatraea* spp. (Lepidóptera: Pyralidae) in sugarcane crops in Central Venezuela. Revista de Biología Tropical (ISSN-0034-7744) 55: 2, 655-658.

Wiedenmann, N. Robert, J.W. Smith, Jr. y Luis A. Rodríguez del-Bosque. 2003. Host suitability of the NewWorld stalkborer *Diatraea considerata* for three Old World *Cotesia* parasitoids. *BioControl* 48: 659–669.

Woodring L. Jennifer y Harry K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Fayetteville, Arkansas, USA. pag. 1–29.

CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEMATODA: STEINERNEMATIDAE), DE VERACRUZ, MÉXICO

Los nematodos entomopatógenos pueden contribuir en la reducción de la población de barrenadores de la caña de azúcar (Ring y Browning, 1990; Legaspi *et al.*, 1997, 2000). Sin embargo, la investigación dirigida hacia el uso eficiente de estos organismos dentro del manejo integrado del barrenador de la caña de azúcar es limitada. Cuando los nematodos se aplican en condiciones controladas (de laboratorio), estos son capaces de causar la muerte del hospedero en 24 - 48 h (Georgis y Gaugler, 1991); pero en condiciones naturales el control del insecto plaga es impredecible. Para incrementar la eficiencia del patógeno en el campo, es necesario contar con aislamientos nativos adaptados a las condiciones ecológicas del hospedero, lo cual podría optimizar los niveles de control, como es el caso específico de *D. saccharalis* (Legaspi *et al.*, 1997). El objetivo principal de este estudio fue investigar la presencia de nematodos entomopatógenos en áreas cañeras pertenecientes a la zona de abastecimiento Central Progreso, ubicado en el Municipio Paso del Macho, Veracruz, realizar la caracterización morfológica y morfométrica de estos organismos que permita determinar su posición taxonómica, la diversidad de nematodos y su posible asociación con el barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis*.

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2. COLECTA DE MUESTRAS

Se realizó una salida al Municipio Paso del Macho, Veracruz donde se tomaron muestras de predios o lotes de dos comunidades con cultivo de caña de azúcar pertenecientes a la zona de abastecimiento del Ingenio Central Progreso: el primer predio perteneciente a la comunidad de Comalcoahuiltl está localizado a 18° 57' latitud Norte y 96° 34' longitud Oeste, a una altura de 279 msnm y el segundo predio de la comunidad de Mata Borrego, está situado a 19° 00' latitud Norte y 96° 38' longitud Oeste, a una altura de 397 msnm. Se colectó un total de 18 muestras de suelo de aproximadamente 1 kilogramo, se tomaron muestras en 9 distribuidos en cada uno de predio. Cada muestra se guardó en bolsas de plástico, se etiquetaron con los datos correspondientes al punto muestreado y se mantuvieron en refrigeración (5°C) hasta su procesamiento.

2.2.1. AISLAMIENTO DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Para la extracción de nematodos entomopatógenos cada una de las muestras se tamizó quitando el exceso de materia orgánica, rocas de mediano y pequeño tamaño que pudiese dañar físicamente al insecto cebo a utilizar, en este caso se usaron larvas del último instar de *G. mellonella*. El suelo se humedeció con agua destilada en una bandeja de plástico de 30 x 40cm aproximadamente, procurando que la humedad fuese uniforme pero también evitando el exceso de agua. El suelo se dividió en cinco submuestras de 200g. cada una, y se colocaron en vasos de plástico con tapadera con capacidad para 300g. Posteriormente,

se introdujeron 3 larvas de *G. mellonella* en cada vaso de plástico, se les colocó la tapadera y se invirtieron con la finalidad de que las larvas de *G. mellonella* se movieran facilitando la infección por los nematodos entomopatógenos, además de que resulta ser una de las técnicas más usadas para la extracción de nematodos entomopatógenos del suelo (Sturhan y Mracek, 2000). Los vasos previamente etiquetados se incubaron en una cámara de cría a 25° C por cuatro días y en seguida, las larvas se extrajeron para ser revisadas con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Las revisiones subsecuentes se realizaron cada tercer día, se observó la presencia de síntomas de infección por NEP que estaban presentes en el suelo muestreado. Las larvas cuya infección fue positiva fueron colocadas en trampas de White (White, 1927; Woodring y Kaya, 1988) para la obtención de juveniles infectivos. Los JI de cada aislado a los 12 días fueron concentrados y lavados con agua destilada estéril manteniéndolos en frascos para cultivo de tejidos (Corning) con volumen de 250 ml en condiciones de laboratorio (22 ± 2 °C).

2.2.2. PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE NEMATODOS

Del muestreo realizado en suelos colectados en áreas de cultivo de caña de azúcar del Municipio Paso del Macho, Veracruz se obtuvieron 3 aislados de nematodos entomopatógenos; dos aislamientos se obtuvieron de la localidad de Comalcoahuatl (P9 y P7); y uno de Mata Borrego (MTB). Para la propagación y obtención de adultos, de los diferentes aislados se inocularon 4 larvas de *G. mellonella* con aproximadamente 100 JI de cada aislados (MTB, P9 y P7) y mantenidas dentro de cajas de Petri de 60x15mm provistas con dos círculos de papel filtro, humedecido con 1.5ml de agua destilada estéril e incubadas

a temperatura ambiente. Transcurridos 3 - 4 días de exposición, se tomaron cuatro larvas de *G. mellonella* y fueron disectadas, con la ayuda de un microscopio estereoscópico, de esta manera se obtuvo la primera generación de nematodos hembras y machos, para finalmente, colocarse dentro de una siracusa con solución salina (pH 7.0).

La segunda generación de nematodos se obtuvo de larvas de *G. mellonella* a los 7 días de infectadas, se disectaron siguiendo el mismo procedimiento mencionado en el párrafo anterior. Una vez obtenidas hembras y machos de primera y segunda generación se procedió a la fijación y montaje de especímenes para su caracterización morfológica.

2.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA:

Se utilizaron las técnicas de microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido, tanto para la obtención de medidas morfométricas de machos y hembras de primera y segunda generación, así como la obtención de las medidas de los juveniles infectivos extraídos con menos de una semana de haber salido de larva de *G. mellonella* de acuerdo a lo recomendado por [Nguyen y Smart Jr. \(1995\)](#).

2.3.1 MICROSCOPIA DE LUZ: PREPARACIÓN DE ESPECIMENES

Los nematodos obtenidos de larvas infectadas de *G. mellonella* se transfirieron a frascos de vidrio de 20ml con un volumen del 50% de su capacidad de agua destilada estéril. Para matar y al mismo tiempo fijar a los nematodos se colocaron en viales de 50ml con formol frío (4° C) al 4%.

Seguido de la muerte de los nematodos se retiró la mayor cantidad de formol posible (evitando absorber los nematodos) y se adicionó nuevamente formol al 4%. El fijador se dejó reposar por una o dos semanas para iniciar el proceso de deshidratación. Los nematodos se pasaron a una caja de Petri de 60x15mm y ésta se colocó, sin cerrar por completo dentro de una cámara de alcohol 96%. Las cajas se dejaron bajo estas condiciones hasta que desapareció el olor a formol, iniciando el proceso de deshidratación de acuerdo al método de [Seinhort \(1959\)](#).

Para iniciar la deshidratación lo mejor posible, se removió lo mayor cantidad posible del fijador con una pipeta o una jeringa de insulina de 1ml (DL), procurando no succionar los nematodos, y se agregó solución A (Etanol 96%: 20 partes / Glicerina 100%: 1 parte / Agua destilada: 79 partes). Pasados dos o tres días se removió la solución A y se agregó la solución B (Etanol 96%: 93 partes / Glicerina 100%: 7 partes) hasta casi llenar la caja, se dejó a temperatura ambiente hasta que se evaporó el alcohol. Una vez que se evaporó la solución B 2/3 de la caja, el líquido se reemplazó con solución C (Etanol 96%: 80 partes / Glicerina: 20 partes). Al término de la evaporación, la cual no olía a alcohol. En este paso la caja de Petri se colocó dentro de una estufa a 40° C durante dos días. Las muestras se colocaron en una cámara de deshidratación con CaCl₂ para remover los restos de agua.

Después de una semana en la cámara de deshidratación, los nematodos se montaron en laminillas de Cobb ([Seinhorts, 1959](#)) y se sellaron con anillos de cera. Los nematodos se fotografiaron en un fotomicroscopio III de Carl Zeiss® conectado a una cámara digital para microscopia Pax Cam. Las imágenes fueron procesadas con el analizador de imágenes Image Tool 3.0 ([Wilcox et al., 2002](#)).

Las descripciones de machos, hembras y juveniles fueron hechas con base en las características morfométricas usadas comúnmente para la identificación de nematodos (Nguyen y Smart, 1995, Qiu *et al.*, 2004, Phan *et al.*, 2003; Stock *et al.*, 2001). Especímenes de la primera y segunda generación de machos y hembras, así como del tercer estado juvenil (JI) de cada aislamiento fueron usados para la caracterización morfológica (Nguyen y Smart, 1993; Stock *et al.*, 2001).

2.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para el procesamiento y visualización de características morfológicas de nematodos por medio de microscopia electrónica de barrido, se siguió una de las técnicas que señala Franco *et al.*, (2000); esta metodología se recomienda para los nematodos fijados tanto en frío como en formol 4%.

Procesamientos de estadios filiformes.

Los especímenes se depositaron en bolsas hechas con papel seda. Cada una de las bolsas se colocó en frascos de 15 ml con agua de la llave 4 °C. El proceso de fijación seguido fue secuencial, iniciando con una concentración baja de fijador que se fue incrementando gradualmente. De acuerdo con Eisenback (1991) la fijación secuencial en frío es mejor que la fijación rápida a temperatura ambiente. De esta manera, las bolsas se colocaron en un volumen conocido de agua corriente (6 ml), mismo al que se le fue añadiendo gotas de una solución al 4% de glutaraldehído y buffer de cacodilato de sodio al 0.1 M y pH=7.0, cada 15 minutos, hasta que alcanzó una concentración del 2%.

Una vez alcanzada la concentración final, la fijación continuó por 24 h a 4 °C. Posteriormente, el material fijado se enjuaga haciendo varios cambios de solución buffer (aproximadamente 6) cada 10 minutos. Seguido de 3 cambios de buffer frío por 15 minutos cada uno, período durante el cual se dejó que las muestras alcanzaran la temperatura ambiente para iniciar el proceso de deshidratación. Para tal efecto, se utilizaron cambios seriales de etanol (5, 10, 25, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%), durante 20 minutos, el último cambio se repitió. Seguido de esto, las muestras se colocaron en una secadora de punto crítico (Samdri-780A, Tosusimis) para remover los fluidos lentamente tanto intercelulares como intracelulares de los especímenes fijados y deshidratados ([Eisenback, 1991](#)).

Los nematodos, una vez secos, fueron montados en portaobjetos para microscopía electrónica de barrido con una cinta de carbón adhesiva por ambas caras; con un pescador muy fino o con una aguja para jeringa de insulina, fueron acomodados en varios ángulos para la observación de los diferentes caracteres. Los nematodos montados se cubrieron con una capa delgada de oro (aproximadamente 20 nm), y se observaron en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM – 6390).

2.3.3. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE AISLADOS

Las laminillas permanentes de los nematodos entomopatógenos permitieron realizar observaciones y mediciones morfométricas, se obtuvieron los rangos (máximo y mínimo) de cada órgano (esófago, espículas, largo y ancho del cuerpo, etc.), así como el valor promedio, lo que permitió comparar los aislados obtenidos con otras especies mencionadas en las claves ([Nguyen *et al.*, 2007](#)). El apoyo de microscopía electrónica de barrido facilitó

la observación de estructuras que no son visibles o son difíciles de observar en preparaciones fijas (laminillas) con microscopio óptico.

2.3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.4.1. DESCRIPCIÓN DEL AISLADO Mata-Borrego MTB

2.3.4.1.1 MACHOS PRIMERA GENERACIÓN

Las observaciones se realizaron en 15 ejemplares, los nematodos en estudio presentaron cuerpo curvado ventralmente, longitud promedio $1724.5\mu\text{m}\pm 114.2$ (1584.3 - 2029.3) (Cuadro 1); al morir tomaron la forma de J (Fig. 2 H), algunos machos (uno de cada tres) presentaron un adelgazamiento tipo cuello o con forma de botella en la región anterior, que internamente inicia desde el bulbo esofágico (Fig. 2 A y D). La cutícula es lisa bajo microscopia de luz, pero con anulaciones a través de microscopia de barrido (Fig. 1 A, B y F). Cabeza redondeada. Región anterior con seis papilas labiales, cuatro papilas cefálicas (Fig. 1 C y E), dos anfídios conspicuos. Cavidad oral triangular, en forma de embudo o corta, queilorabdions pequeños y esclerotizados, algunas veces inconspicuos. Esófago muscular, procorpus cilíndrico, metacorpus ligeramente adelgazado; sin valvas; istmo distinto; bulbo basal piriforme (Fig. 2 E); válvula esofágica diferenciada. Anillo nervioso localizado en la región anterior del bulbo esofágico (Fig. 2 B). Válvula esófago intestinal presente. Poro excretor localizado cerca de la región media del esófago (Fig. 1 D). Testículo monorquido, reflejado. Presenta doce pares de papilas genitales (Fig. 1 A y B) y una individual, arregladas de la siguiente forma: seis precloacales, una media ventral

precloacal; papilas cloacales, dos pares localizadas ventralmente y un par lateral; y tres pares de papilas post cloacales. Cola conoide sin bursa ni mucrón, fasmidios inconspicuos.

Espículas pareadas de un color amarillo/dorado, (Fig. 2 C) curvadas; rango longitud/anchura = $71.5\mu\text{m} \pm 3$ (65.1 – 77.4); manubrio (cabeza) elongado, redondeado, presencia de calomus corto. Lamina moderadamente curvada, con dos costillas internas proyectándose hacia la punta, velum presente (Fig. 3 A y B), sin proyectarse hasta el final de la espícula. Lamina de la espícula con dos lóbulos, ventral y dorsal. Gubernáculo, en forma de trapecio en vista lateral, ligeramente curvado en el extremo proximal, extremo anterior alargado (Fig. 3 C y D); alas del corpus abiertas posteriormente (Fig. 2 C), cuneus presente en forma de aguja. Las medidas se encuentran en el Cuadro 1.

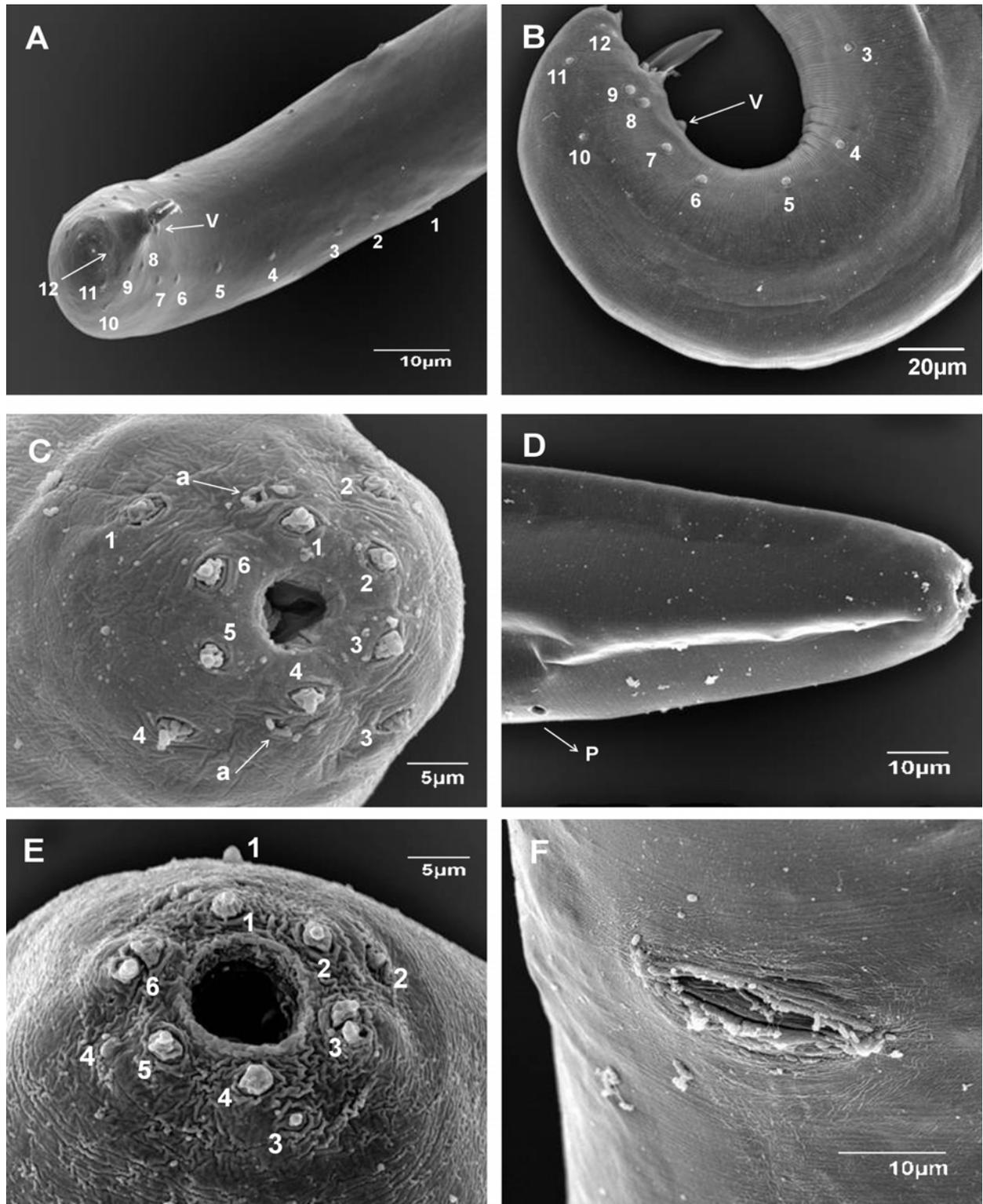


Fig. 1. Microscopía electrónica de barrido primera generación *Steinernema* sp. A-B, cola de machos mostrando la distribución de papilas genitales, v= papila ventral. C, región cefálica mostrando el estoma del macho y la hembra, a= anfidos, (E); 6 papilas labiales, 4 cefálicas y 2 anfidos. D, región anterior del macho mostrando el poro excretor. F, vulva ubicada en la porción media ventral del cuerpo.

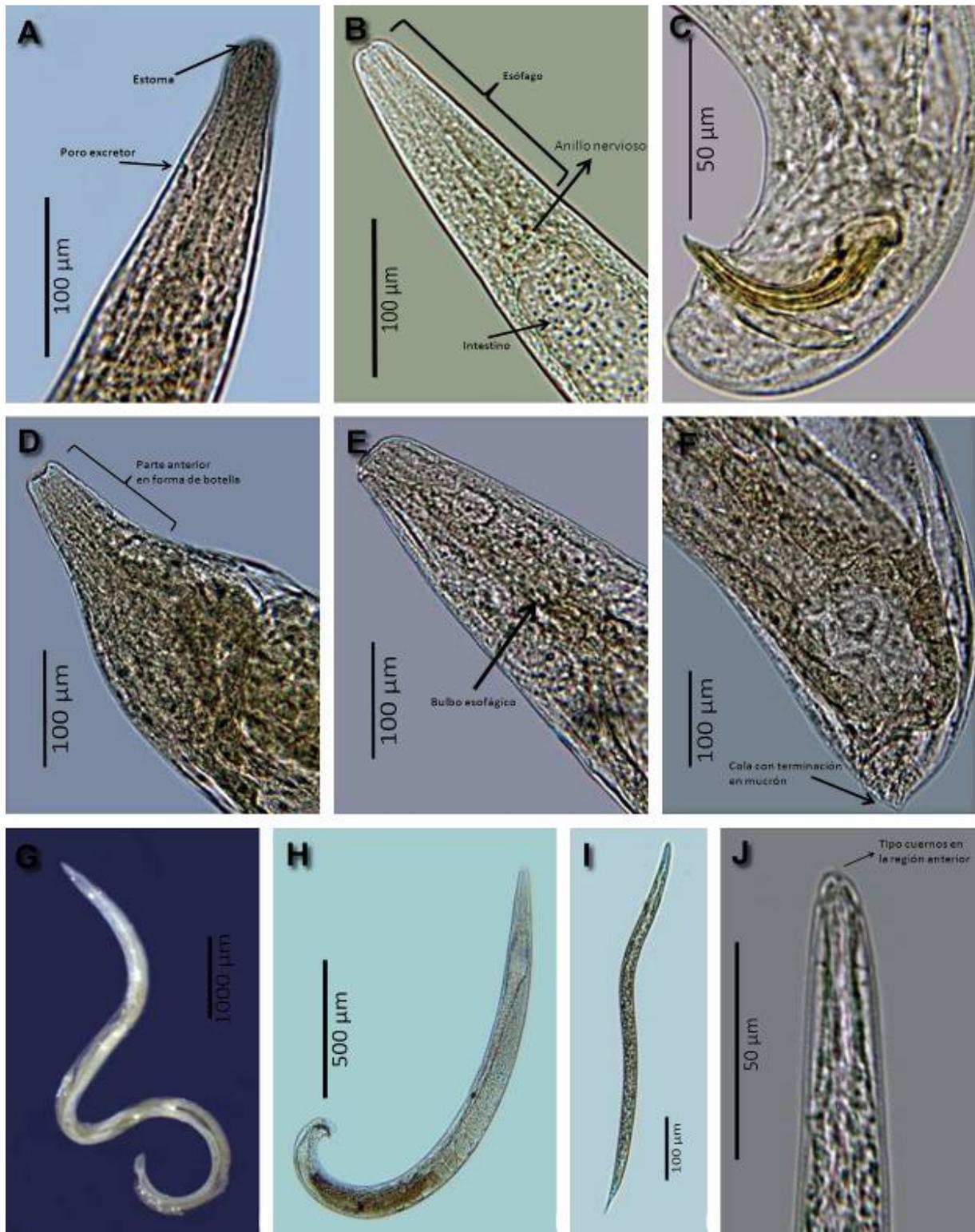


Fig. 2. *Steinernema* sp. primera generación, microscopía de luz; A-B región cefálica de machos, y D-E región cefálica de la hembra mostrando la terminación en forma de botella (A-D) y normal. C, espículas terminadas en punta. F, cola de la hembra con proyección tipo mucrón. G, hembra gigante primera generación. H, macho con posición en forma de J al morir. I-J, juvenil infectivo, región cefálica tipo corona.

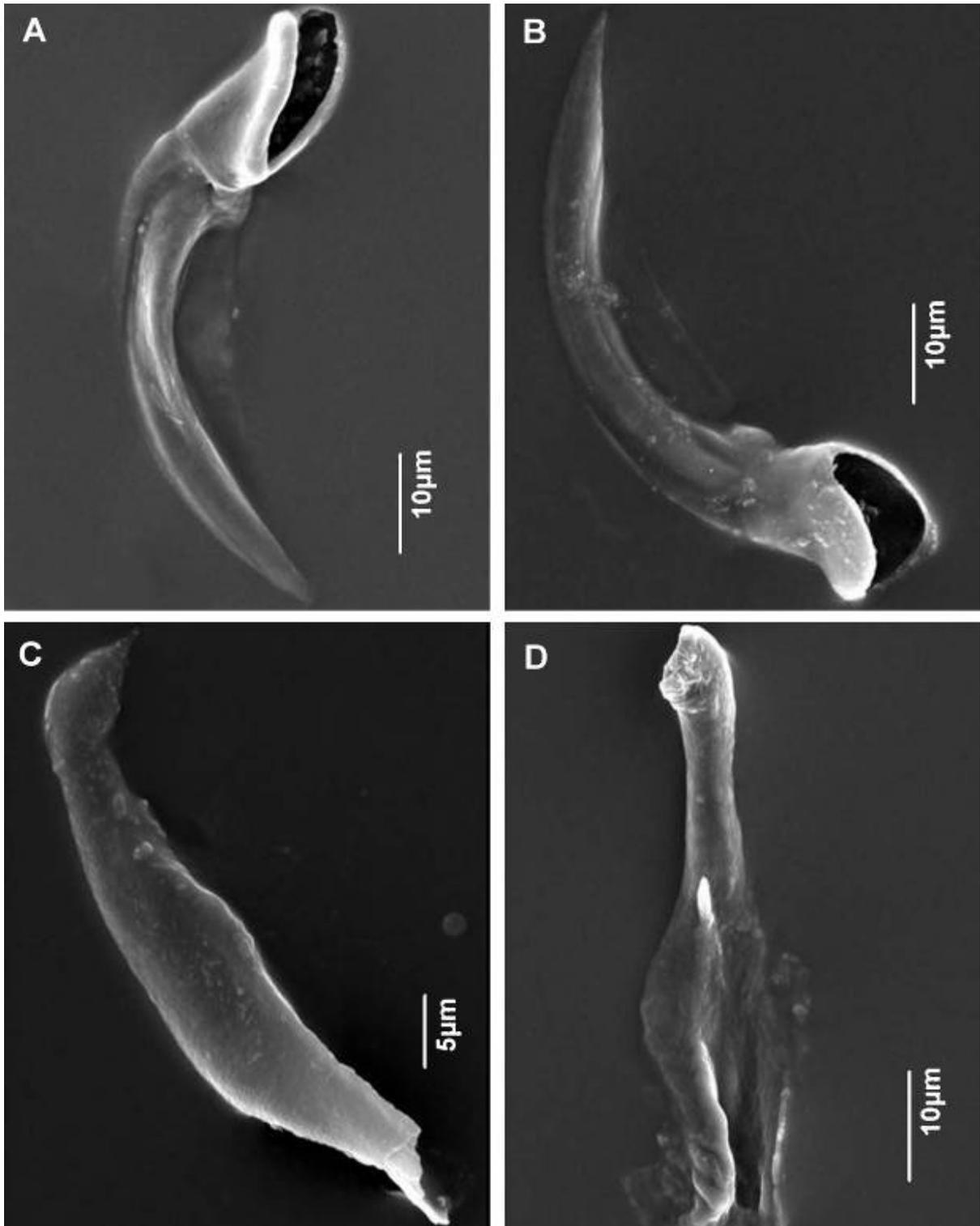


Fig. 3. Espículas y gubernáculum de primera generación de machos. A-B, espículas terminadas en punta y con presencia de velum. C-D, vista dorsal y frontal del gubernáculum.

2.3.4.1.2 MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN

La segunda generación de machos es similar a la primera excepto por el tamaño del cuerpo $1336.2\mu\text{m} \pm 72.2$ (1215.8 - 1439.1), ligeras variaciones en el tamaño de las espículas y gubernáculum, rango longitud/anchura = $68.2\mu\text{m} \pm 3.9$ (58.2 - 73.8). Los machos al igual que los de la primera generación, presentan un adelgazamiento formando un tipo cuello o con forma de botella en la parte anterior (Fig. 2 A), que inicia desde el bulbo basal, teniendo una proporción de 1 a 3 de cada macho normal. Las medidas se presentan en el Cuadro 2.

2.3.4.1.3 HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN

Longitud promedio $8259 \mu\text{m} \pm 918.7$ (7050 - 9730). Algunas hembras presentan un adelgazamiento formando un tipo cuello o con forma de botella en la parte anterior (Fig. 2 A), que inicia desde el bulbo basal, teniendo una proporción de 1 a 3 de cada hembra normal. Cutícula del cuerpo con una fina anulación. Campos laterales y fasmidios no visibles. Región cefálica redondeada y ligeramente angosta. Presencia de seis papilas labiales y cuatro cefálicas. Labios poco sobresalientes. Estoma superficial, subtriangular anteriormente (Fig. 1 E). Queilorhabdions poco esclerotizados, pequeños, algunas veces incóspicuos. Esófago con procopus cilíndrico, muscular, istmo visible, con un marcado adelgazamiento; bulbo basal como en otros esteinernematidos. Anillo nervioso rodeando al istmo y localizado en la porción anterior al bulbo basal. Válvula del esófago-intestinal presente. Poro excretor localizado anterior al anillo nervioso. Gónadas anfídelficas,

reflejadas. Vulva con la abertura situada transversalmente en un área sobresaliente (Fig. 1 F). Cola en forma triangular con una ligera proyección en forma de mucrón (Fig. 2 F).

2.3.4.1.4 HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN

La segunda generación de hembras es muy similar a la primera generación pero más pequeñas, con un promedio de la longitud del cuerpo $4625 \mu\text{m} \pm 480.9$ (3970 - 5300). El término de la cola presenta una forma más redondeada que la de la primera generación. Las hembras presentan un adelgazamiento formando un tipo cuello o con forma de botella en la parte anterior, que internamente inicia desde el bulbo basal, teniendo una proporción de 1 a 3 de cada hembra normal.

2.3.4.1.5 JUVENILES INFECTIVOS

Las medidas se encuentran en el cuadro 1. Juveniles infectivos con una longitud media de $581.3 \mu\text{m} \pm 35$ (524.2 - 749.9 μm). Los especímenes fijados varían de una posición recta mostrando algunas veces una curvatura irregular. El cuerpo es delgado, con una pequeña reducción en la parte anterior y un adelgazamiento en la parte posterior terminando en punta. Los anillos cuticulares son vagos o pocos distinguibles a través de microscopia de luz, pero evidentes en microscopia electrónica de barrido. Los campos laterales comienzan anteriormente con una línea entre la octava y décima anulación (Fig. 4 A). Después de dos porciones del tamaño de la cabeza comienzan a aparecer dos líneas formando los primeros 2 campos laterales; cerca del poro excretor se localizan 4 campos; en la región media del cuerpo presenta un total de 8 (Fig. 4 B), disminuyendo al nivel del ano a 5 campos laterales

(Fig. 4 C); justo antes del fasmidio se presentan 4, para después reducirse a 2 campos laterales (Fig. 4 D). La fórmula de los campos laterales corresponde a: 2, 4, 5, 8, 7, 6, 5, 4, 2. Longitud de la cola casi cuatro veces tan larga como el ancho del cuerpo a nivel del ano. D % = 76 y E % = 81.6.

Fasmidio presente cerca de la región media de la cola, localizado ventral al campo lateral (Fig. 4 D). Región de la cabeza redondeada, con un ligero adelgazamiento en la primera anulación del cuerpo (Fig. 2 J y Fig. 4 A), sin presencia de anillos. Estoma del JI cerrado. Presencia de 4 papilas cefálicas, papilas labiales no visibles. Región labial con estructuras en forma de cuernos (Fig. 4 A). Anfidio visible. Faringe con procorpus ligeramente amplio, estrechándose en el istmo y con un bulbo basal subpiriforme con una débil válvula desarrollada. Poro excretor localizado después del anillo nervioso (en el tercio posterior del bulbo basal), cuticularizado. Recto largo y estrecho; ano distinto. Cola conoide con terminación en punta (Fig. 2 I y Fig. 4 D). Porción hialina ocupando aproximadamente 60% de la longitud total de la cola.

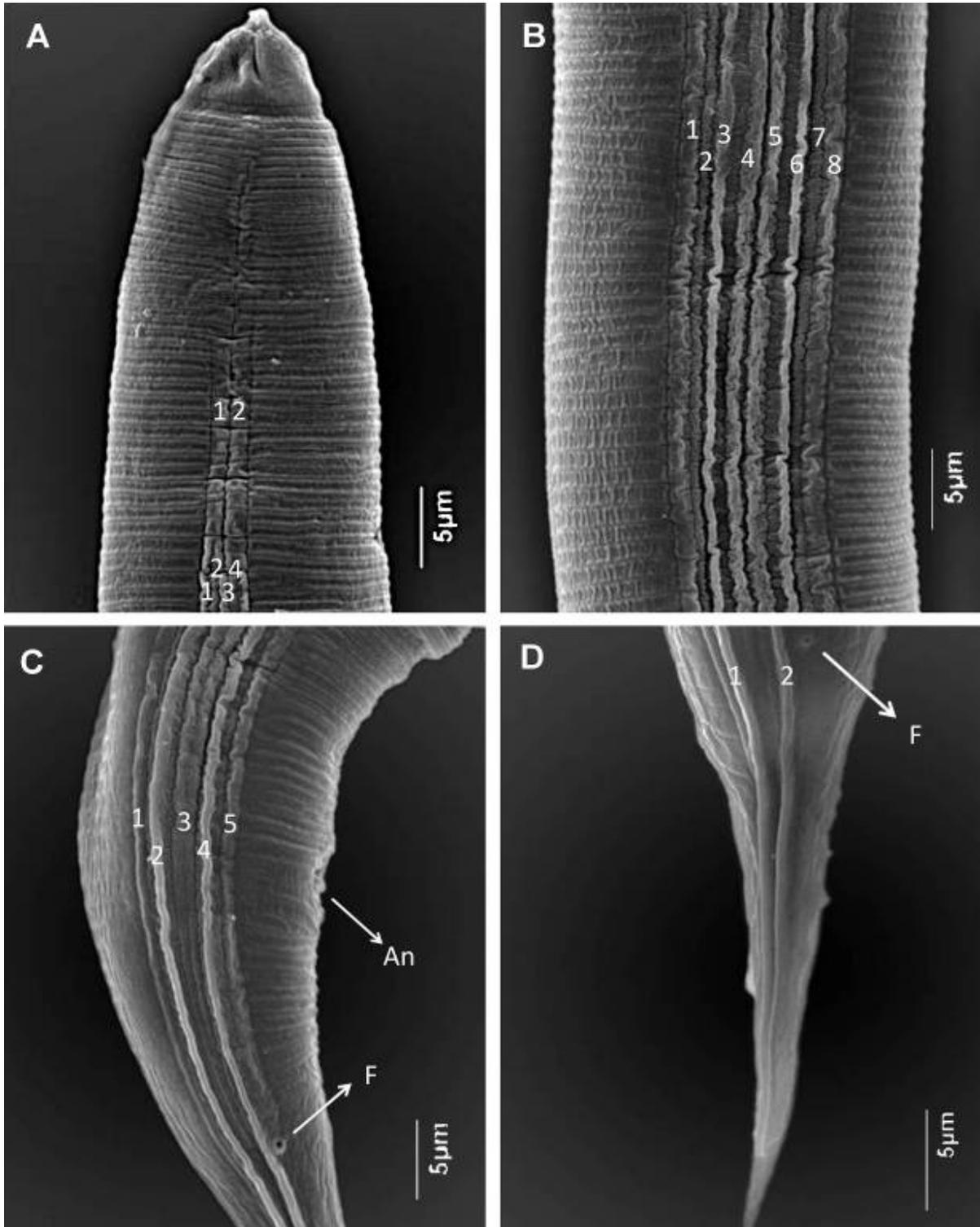


Fig. 4. Juveniles infectivos. A, región anterior mostrando la presencia de proyecciones tipo cuernos. A-D, disposición y división de campos laterales (2, 4, 5, 8, 7, 6, 5, 4, 2) en JI. C, fasmidio (F) localizado después del ano (An). D, terminación de la cola en forma de punta.

2.3.4.2 DESCRIPCIÓN DEL AISLADO Comalcoahuatl P9

2.3.4.2.1 MACHOS PRIMERA GENERACIÓN

La descripción coincide con las características mencionadas para el aislado MTB. La longitud promedio del cuerpo no mostró mucha variación $1721.6 \mu\text{m} \pm 124.6$ ($1549.4 - 1920.9 \mu\text{m}$), comparados con el aislamiento MTB; así como los valores máximos y mínimos, los cuales se encuentran muy cercanos entre sí. No sólo el largo del cuerpo es muy similar, sino también el largo de la cola $24.3 \mu\text{m} \pm 8$ (TL), la longitud de las espículas $59 \mu\text{m} \pm 17.5$ (SpL) y el gubernáculum $40 \mu\text{m} \pm 12.4$ (GuL) (Cuadro 1).

2.3.4.2.2 MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN

Son de menor tamaño comparados con los machos de primera generación, con una longitud promedio $1543.6 \mu\text{m} \pm 77.4$ ($1418.5 - 1660.8 \mu\text{m}$); se observa alta coincidencia con las características y valores dados para MTB (Cuadro 2); así como la característica distintiva en algunos organismos de la región anterior en forma de botella.

2.3.4.2.3 HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN

La descripción del primer aislado (MTB) coincide con todas las características morfológicas de las hembras de primera generación del aislamiento P9. Sin embargo la longitud mínima y máxima del cuerpo así como la desviación estándar de estos valores, mostró que son ligeramente más largos $8435 \mu\text{m} \pm 1458.9$ ($6400 - 10710 \mu\text{m}$).

2.3.4.2.4 HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN

Las hembras presentan características similares a las descritas para MTB, sin embargo, se observa que el promedio general del largo del cuerpo de la población P9 es más corto $4485 \mu\text{m} \pm 767.8$ (3480 – 5610 μm) (Cuadro 2).

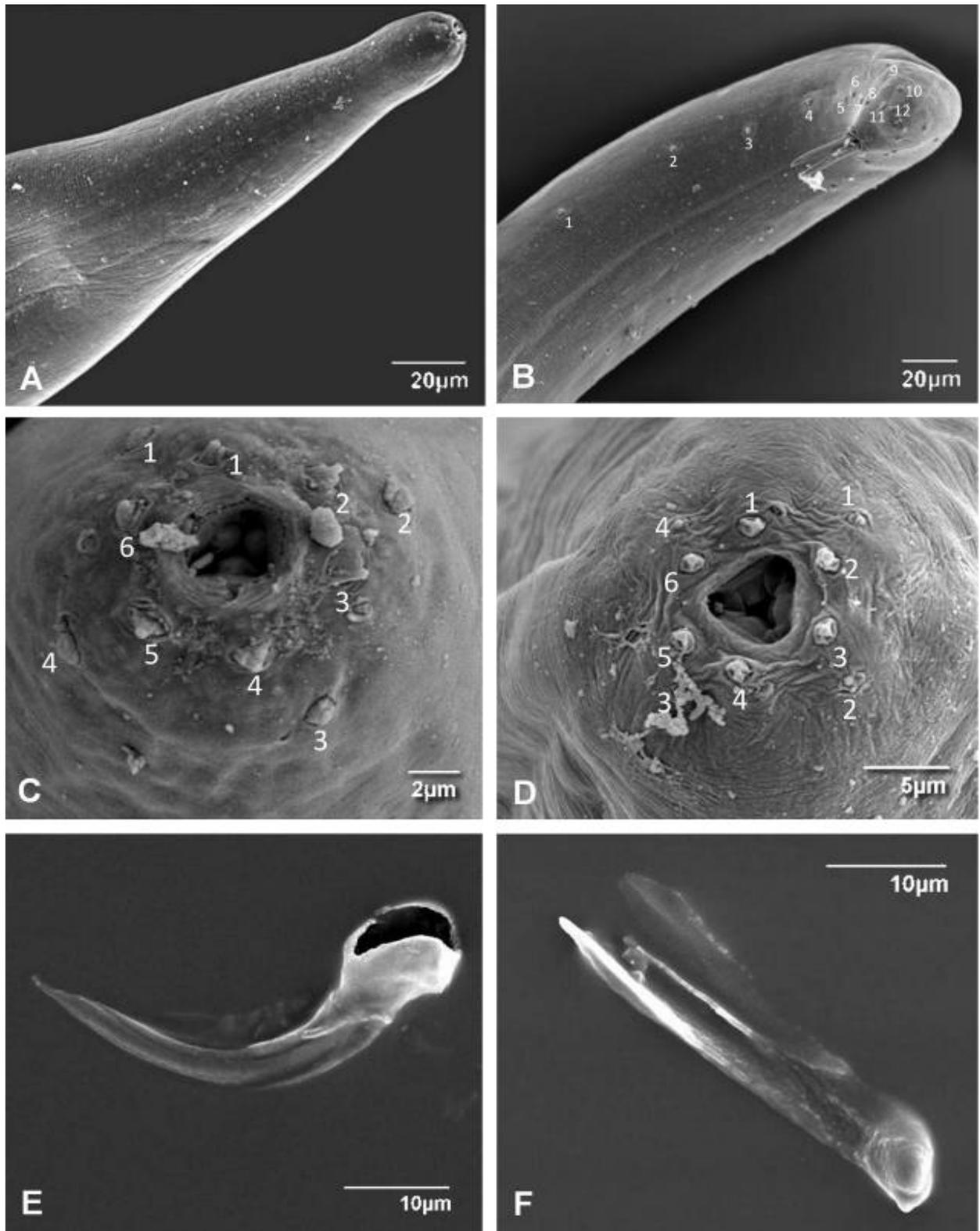


Fig. 5. *Steinernema* sp. Primera generación. A, región anterior con terminación en forma de botella. B, papilas genitales; 12 pares de papilas pareadas y una papila independiente. C-D, vista anterior mostrando un anillo oral, 6 papilas labiales y 4 cefálicas de machos (C) y hembras (D). E-F, vista lateral de la espícula y vista frontal del cuneus en forma de aguja.

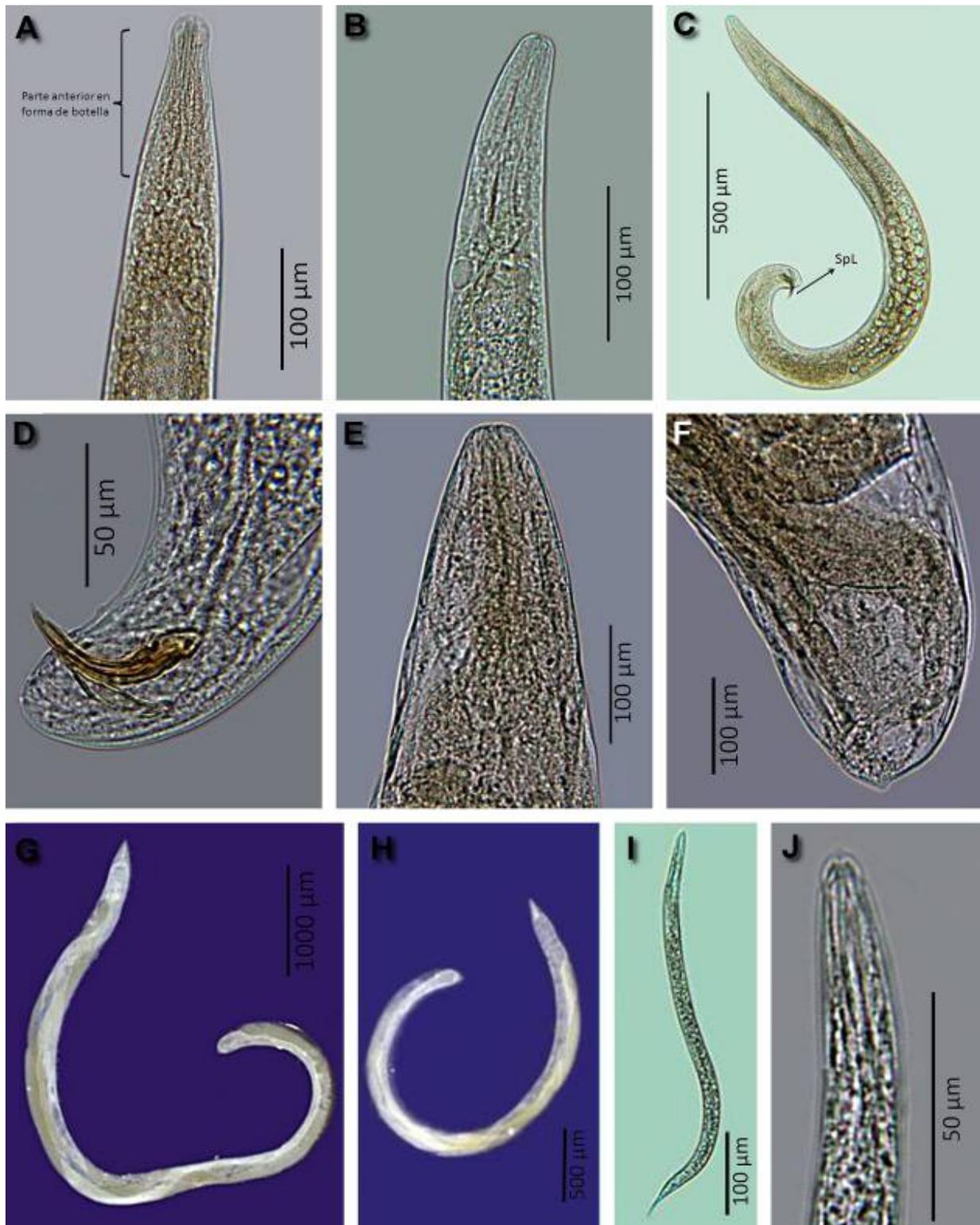


Fig. 6. *Steinernema* sp. A-B, primera generación de machos. B, región cefálica en forma de botella y normal (A-E). D, parte posterior del macho donde se muestran las espículas y el gubernáculo. E, región anterior y F, región posterior de hembras de primera generación. G y H, hembras de primera y segunda generación. I y J, juvenil infeccioso y región anterior.

2.3.4.2.5 JUVENILES INFECTIVOS.

Las características son similares a las dadas para MTB, el promedio del largo del cuerpo $576.5 \mu\text{m} \pm 44.8$ ($502.4 - 652.7 \mu\text{m}$). $D\% = 70$ y $E\% = 78.8$. Se observa variación en el arreglo de los campos laterales, siendo éstos: 2, 4, 5, 8, 7, 6, 5, 4, 2 (Cuadro 1).

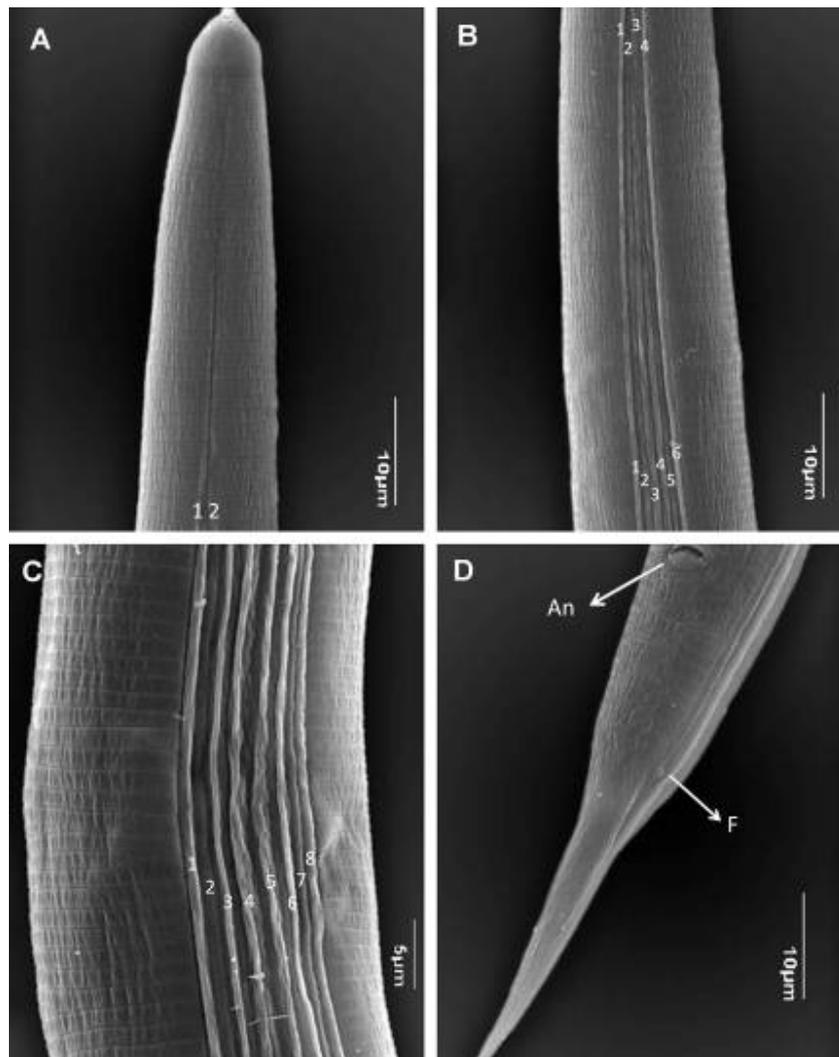


Fig. 7. Campos laterales de juveniles infectivos *Steinernema* sp. A, región anterior mostrando estructuras tipo cuernos, con un campo lateral anterior y dos posteriores. B, campos laterales mostrando las divisiones de cuatro a seis. C, Ocho campos laterales. D, reducción de campos laterales (2, 4, 5, 8, 7, 6, 5, 4, 2), ubicación de fasmidio (F), ano (An) y la terminación de la cola en punta.

2.3.4.3 DESCRIPCIÓN DEL AISLADO Comalcoahuil P7

2.3.4.3.1 MACHOS PRIMERA GENERACIÓN

El aislado P7 presenta características similares con MTB y P9 incluyendo el promedio y los rangos del promedio del largo del cuerpo $1814.2 \mu\text{m} \pm 191.2$ ($1624.1 - 2285.7 \mu\text{m}$); sin embargo estos ligeramente más largos (Cuadro 1).

2.3.4.3.2 MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN

El tamaño es menor que los machos de primera generación, el promedio del rango del cuerpo está dentro de los rangos de los aislados MTB y P9 (Cuadro 2), pero con una desviación estándar en este aislamiento que es mayor a $1396.4 \mu\text{m} \pm 138.5$ ($1303.1 - 1586.3 \mu\text{m}$).

2.3.4.3.3 HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN

El promedio del largo del cuerpo $7947 \mu\text{m} \pm 1100.5$ ($6680 - 10450 \mu\text{m}$), es ligeramente menor al mencionado en los aislamientos MTB y P9. Comparte todas las características de los aislados antes descritos, así como la característica con terminación en forma de botella de la región anterior (Cuadro 1).

2.3.4.3.4 HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN

Su tamaño es menor a las hembras de primera generación y similar en tamaño y características de las hembras de segunda generación de MTB y P9. Sin embargo son ligeramente más pequeños (Cuadro 2), pero se encuentran dentro de los rangos de las medidas que se indican en el Cuadro 1.

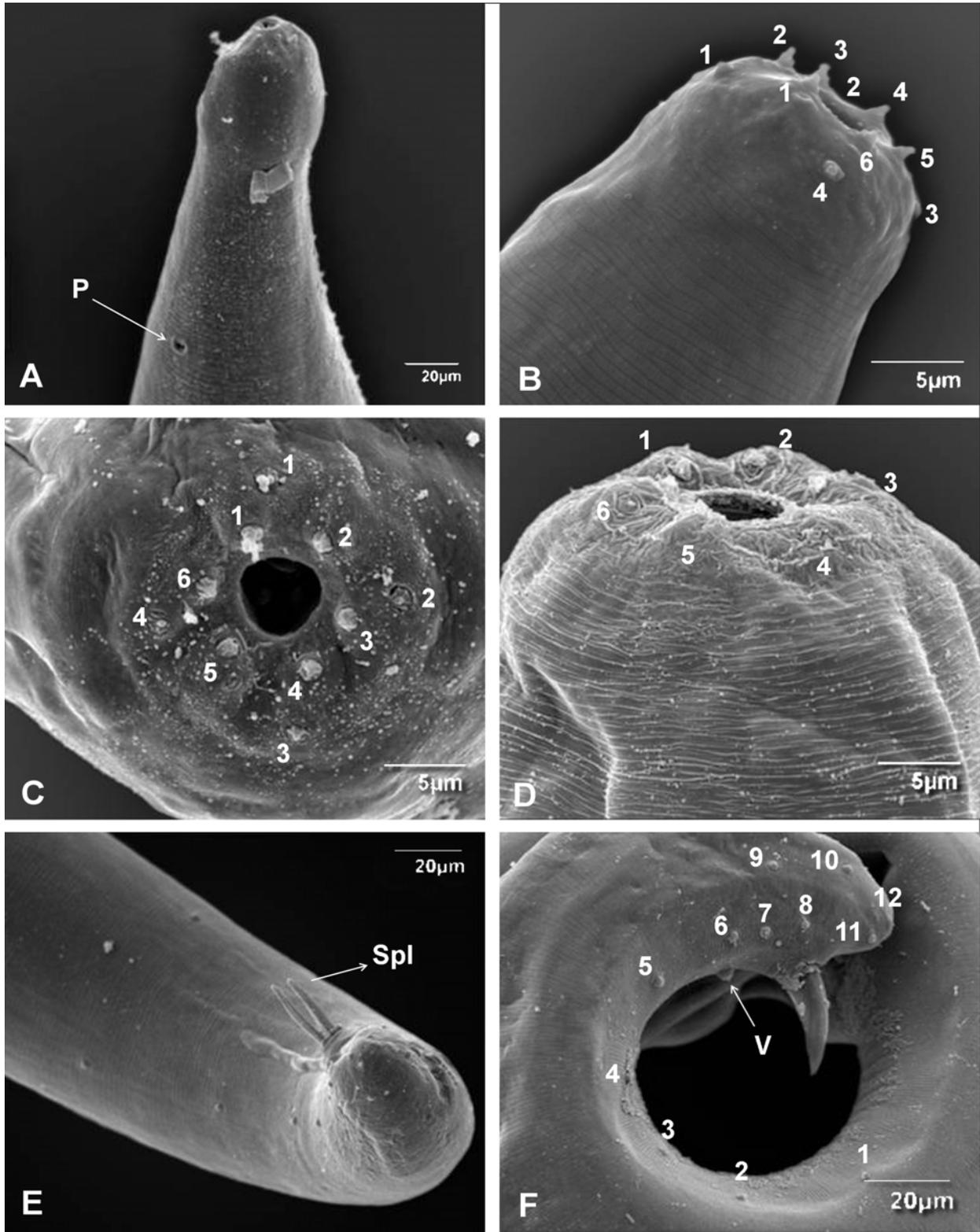


Fig. 8. *Steinernema* sp. A, región anterior de machos con terminación en forma de botella y B, machos con región cefálica normal. C-D, papilas cefálicas y labiales de hembras de primera generación. E-F, disposición de papilas caudales y espículas (Spl) pareadas y con terminación en punta.

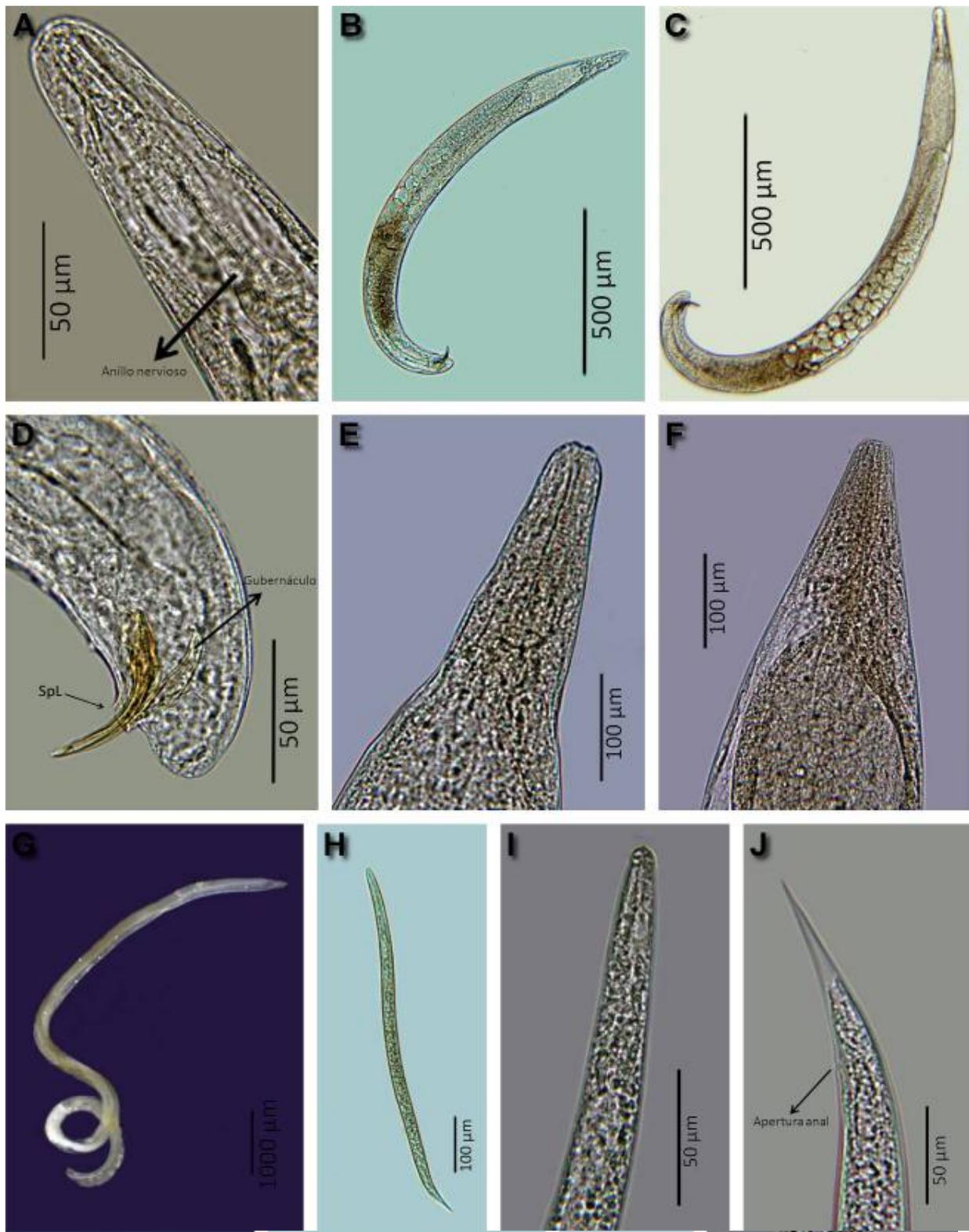


Fig. 9. *Steinernema* sp. microscopia de luz; A región cefálica de machos, B y C macho con posición de J al morir; D espículas terminadas en punta; E región cefálica de la hembra mostrando la terminación en forma de botella y (F) normal; G hembra gigante primera generación; H juvenil infectivo; I juvenil infectivo con región cefálica tipo corona y cola en punta (J).

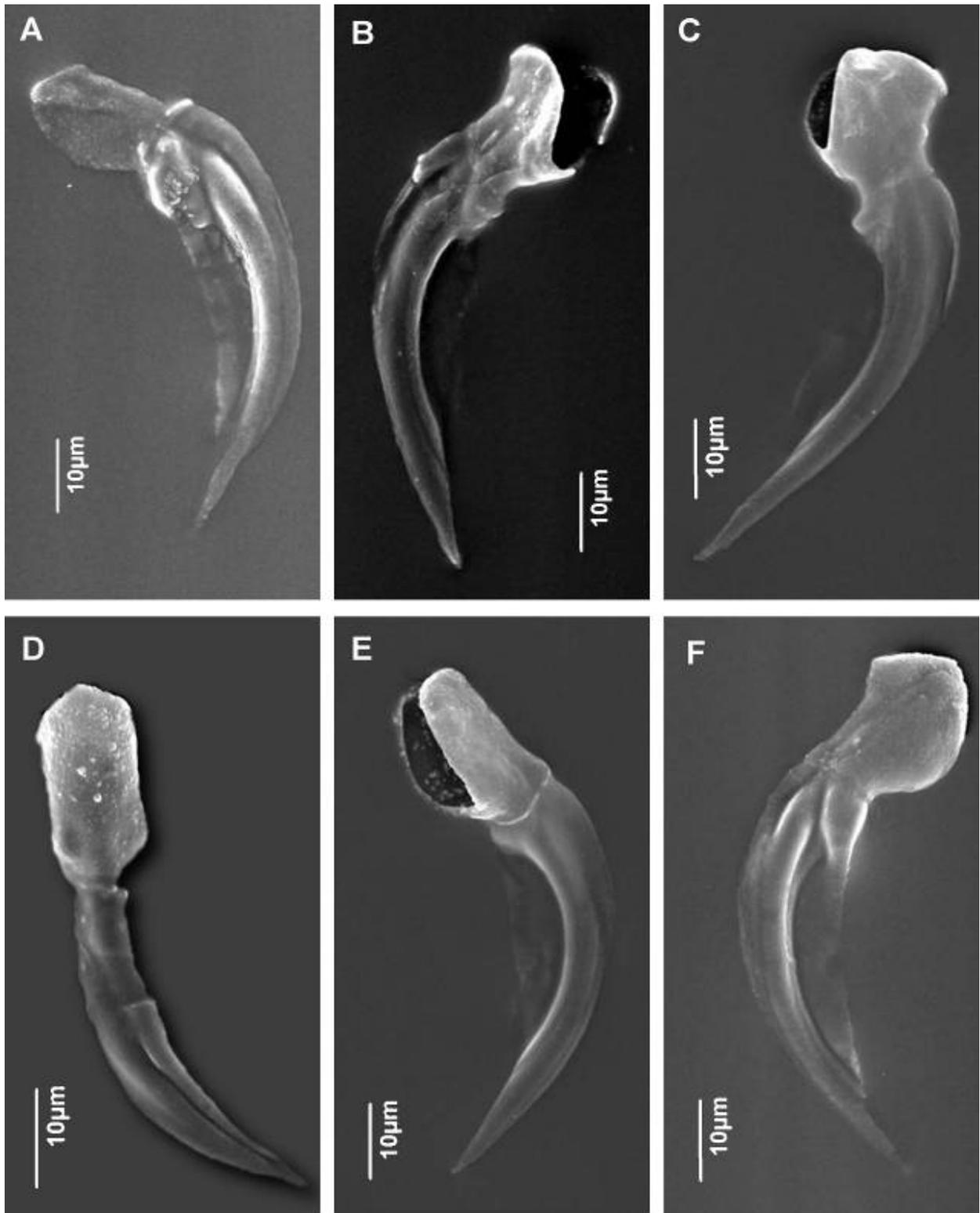


Fig. 10. *Steinerema* sp. Espículas de machos de primera generación, mostrando la variabilidad de formas de las cabezas de las espículas, así como la presencia de velum.

2.3.4.3.5 JUVENILES INFECTIVOS

La longitud promedio del cuerpo es $617.5 \mu\text{m} \pm 31.8$ ($571.3 - 674.7 \mu\text{m}$), fue ligeramente mayor que la de MTB y P9, sin embargo se encuentra dentro de los rangos máximos y mínimos. Formula de los campos laterales similar al aislado MTB, con una disposición: 2, 4, 5, 6, 8, 6, 5,4, 2 (Cuadro 1).

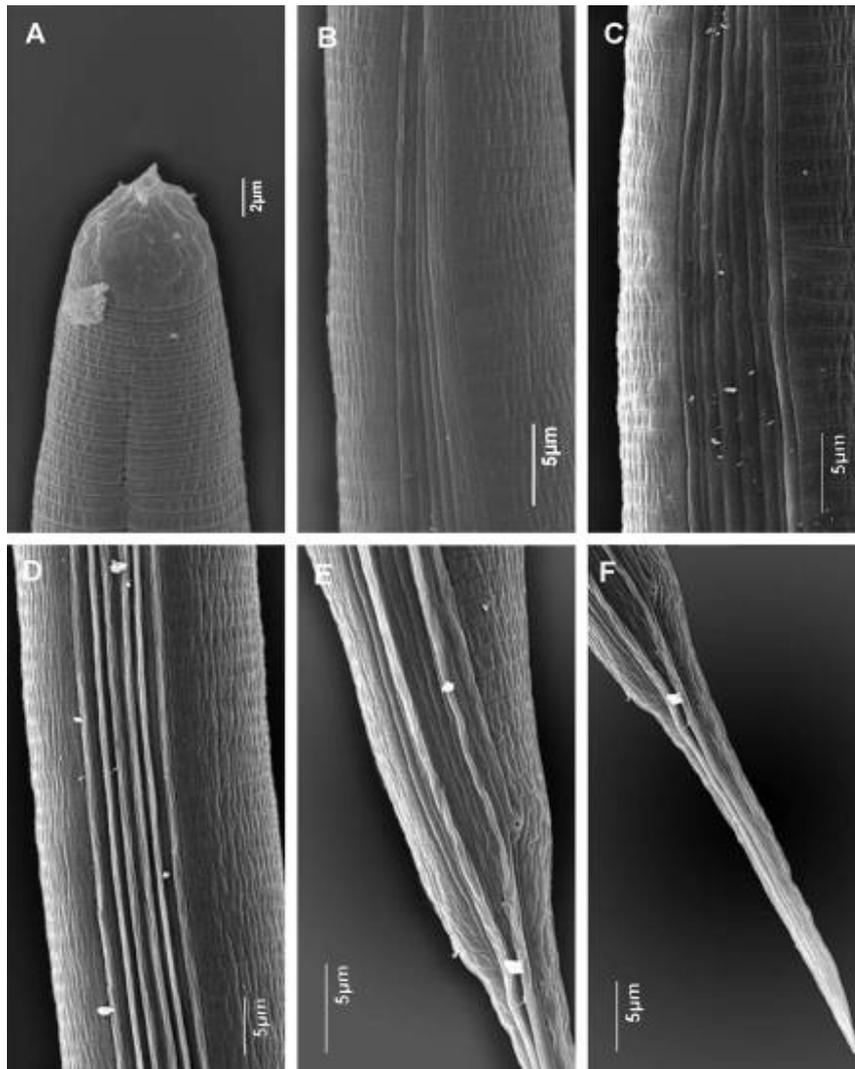


Fig. 11. *Steinernema* sp. juveniles infectivos. A, región cefálica con proyecciones tipo cuernos. B-C y D, disposición de campos laterales (2, 4, 5, 6, 8, 6, 5,4, 2). E-F, se muestra el fasmidio ubicado después del ano, así como la terminación en punta.

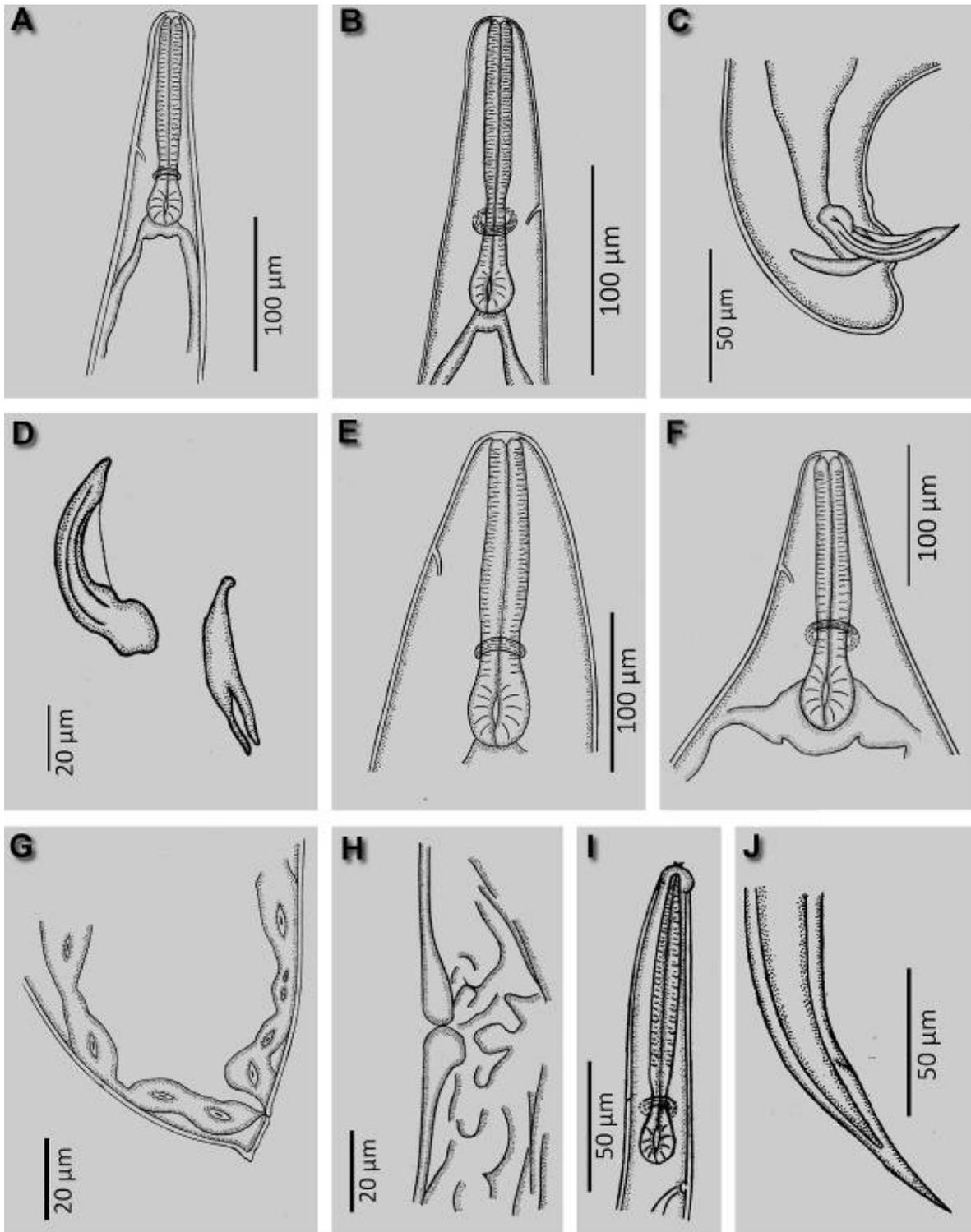


Fig. 12. *Steinernema* sp. dibujos en microscopia de campo claro. A-B, machos de primera generación con terminación en forma de botella (A) y normal (B). C, parte posterior de machos de primera generación y espículas y gubernaculum (D). E, hembras con terminación normal y terminación con forma de botella (F) de primera generación. G, región posterior de las hembras de primera generación con terminación en mucrón. H, vulva de la hembra en vista dorsal. I, juveniles infectivos con proyecciones tipo cuernos y, terminación de la cola en punta (J).

Cuadro 1. Morfometría de machos y hembras de primera generación y juveniles infectivos de los tres aislamientos de <i>Steinernema</i> sp.									
Cepa Carácter	Machos			Hembras			Juveniles Infectivos		
	Mataborrego	Comalcoahuiltl P9	Comalcoahuiltl P7	Mataborrego	Comalcoahuiltl P9	Comalcoahuiltl P7	Mataborrego	Comalcoahuiltl P9	Comalcoahuiltl P7
N	15	13	11	10	10	10	40	40	40
TBL	1724.5±114.2 (1584.3- 2029.3)	1721.6±124.6 (1549.4- 1920.9)	1814.2±191.2 (1624.1- 2285.7)	8259±918.7 (7050-9730)	8435±1458.9 (6400-10710)	7947±1100.5 (6680-10450)	581.3±35 (524.2-749.9)	576.5±44.8 (502.4-652.7)	617.5±31.8 (571.3-674.7)
MBW	130.2±17.8 (109-174.1)	101.1±32 (61-152.1)	122.6±14.2 (104.9-135.8)	280±30.5 (220-320)	313±20 (360-390)	270±28.7 (240-320)	27.5±2.1 (24-34.8)	25.9±2.5 (20.9-29.7)	26.2±1.4 (23-28.4)
EP	93.2±9.6 (78-108.3)	59±18.6 (35.7-85.8)	74.1±15.2 (49-94.5)	89.1±8.5 (74.7-100.7)	100.9±16.4 (81.8-137)	96±7.4 (81.3-103.5)	47±3 (39.5-53.3)	45.6±2.8 (41.8-49.7)	45.8±10.7 (43.1-51.7)
NR	115.7±6.5 (104.3-127.6)	90.3±30 (49.3-122.4)	177.7±8.4 (102.7-126.4)	138.4±10.8 (126.2-137.1)	141.1±20.2 (116.4-191.2)	145.2±11.8 (131.6-169.5)	52.6±3 (45.9-58.3)	55.1±3 (50.1-61.3)	53.8±2 (48.1-57.4)
ES	149±8.2 (137-167.1)	117.1±39.4 (62.4-160.2)	149.9±14.8 (117.4-157.7)	191.1±21.6 (158.6-219.5)	199.5±30 (183-277.5)	201.3±11.6 (186.5-220)	62±3.5 (55.1-69.9)	65.1±4.7 (55.3-75.2)	62.6±3.7 (57.6-63.3)
TL	32.4±2.9 (26.5-37.6)	24.3±8 (12.6-34)	33.4±2.4 (27.7-33.4)	61.5±9 (49.3-81.1)	66.2±16.1 (51.7-96.6)	72.8±11.3 (59.2-93.2)	57.9±4.6 (47.8-76.2)	57.8±3.7 (49.8-64.7)	60.1±3.2 (55.3-67.7)
ABW	56.2±3.2 (51.3-60.8)	44.7±13.4 (28-57)	55±2.7 (52.7-60.1)	85.3±10.4 (72.7-103.7)	99.9±21.4 (81.7-137.7)	93.1±10.5 (78.9-109)	15.2±0.9 (13.9-17.5)	14.5±1.1 (12.7-16.9)	15.3±1.6 (13.4-17.2)
SpL	71.5±3 (65.1-77.4)	59±17.5 (37-75)	75.4±3.9 (68.7-78.4)						
GuL	48.4±3.4 (38.8-54.5)	40±12.4 (23-52)	48.4±5.4 (40.8-54.2)						
a=TBL/MBW	13.2	17	14.8	29.5	26.9	29.4	21.1	22.3	23.5
b=TBL/ES	11.6	14.7	12.1	43.2	42.3	39.5	9.4	8.8	9.8
c = TBL/TL	53.2	70.8	58.6	134.2	127.3	109.1	10	10.7	10.3
D%= EP/ESx100	62.7	50.4	49.4	46.6	56.6	47.7	75.8	70	73.2
E%= EP/TLx100	287.8	242.8	236.7	144.7	152.3	131.7	81.2	78.8	76.2
SW= SpL/ABWx100	130	130	140						
GS= GuL/SpLx100	70	70	60						
FL							2, 4, 5, 8, 7, 6, 5, 4, 2	2, 4, 5, 6, 8, 6, 5, 4, 2	2, 4, 5, 6, 8, 6, 5, 4, 2

Los rangos máximos y mínimos de las medidas (μm) son dados en el paréntesis, así como en la parte superior se encuentra la media±DS. Abreviaturas: n= número de individuos medidos, TBL= longitud del cuerpo, MBW= anchura máxima del cuerpo, EP= Distancia región anterior-poro excretor, NR= distancia región anterior-anillo nervioso), ES= longitud del esófago, TL= longitud de la cola, ABW= diámetro cuerpo-región anal, SpL= longitud de la espícula, GuL= longitud del gubernáculo, FL= núm. de costillas del campo lateral.

Cuadro 2. Morfometría de machos y hembras de segunda generación de los tres aislamientos de <i>Steinernema</i> sp.						
	Machos			Hembras		
Cepa	Mataborrego	Comalcoahuil P9	Comalcoahuil P7	Mataborrego	Comalcoahuil P9	Comalcoahuil P7
Carácter						
n	13	12	11	10	10	10
TBL	1336.2±72.2 (1215.8-1439.1)	1543.6±77.4 (1418.5-1660.8)	1396.4±138.5 (1303.1-1586.3)	4625±480.9 (3970-5300)	4485±767.8 (3480-5610)	4209±559.7 (3350-5430)
MBW	115.6±9.6 (95.5-132.5)	115.7±21.5 (83-153.6)	109.1±23.2 (80.2-148.4)	205±11.8 (180-210)	184±27.2 (150-240)	191±21.3 (160-220)
EP	66.1±9.2 (53-82.9)	87.6±8.7 (76.1-104.8)	84.2±10 (62-95.7)	82.3±13 (67.4-109.5)	82.2±7.7 (71.5-94.1)	80.4±8.7 (72-94)
NR	107.6±9.8 (86.8-121.3)	119.3±11.4 (99-136.6)	115.6±9.5 (99.4-127)	123.2±12.1 (106.2-139.9)	116±6.4 (102.9-123.4)	122±7.5 (112-137.4)
ES	136.5±13.6 (102.2-155.7)	150.2±10.8 (131-167.5)	148.2±9.5 (130.6-158.3)	170.4±11.4 (1557.3-193.6)	165.1±11.6 (145.6-177.8)	164.6±16.7 (127.5-183)
TL	26.1±3.7 (22.5-34.1)	31±1.4 (29.7-33.1)	30.3±2.1 (27.6-33.1)	55.4±7.5 (47.9-71.8)	55.3±6.4 (47.9-66.3)	55±6.3 (48-66.5)
ABW	52.5±2.7 (48.5-56.1)	52.3±4.7 (47-58)	52.2±4.6 (44.3-57)	75.2±11 (60.1-91.7)	71.7±8.2 (58.3-84.5)	67±10.8 (49.1-82.2)
SpL	68.2±3.9 (52.8-73.8)	72.3±4.8 (66.1-79.3)	70.2±5 (63-77.3)			
GuL	47.2±3.5 (41.7-54.6)	47.6±4 (37.1-53)	46.7±4.5 (37.5-53)			
a=TBL/MBW	11.5	13.3	12.8	22.6	24.4	22.1
b=TBL/ES	9.8	10.3	9.4	27.1	27.2	25.6
c = TBL/TL	51.1	50	46.1	83.5	81.1	76.5
D%= EP/ESx100	48.4	58.3	56.8	48.3	49.8	48.9
E%= EP/TLx100	252.8	286.3	278	148.6	148.5	146.1
SW= SpL/ABWx100	130	140	130			
GS= GuL/SpLx100	70	70	60			

Los rangos máximos y mínimos de las medidas (μm) son dados en el paréntesis, así como en la parte superior se encuentra la media \pm DS. Abreviaturas: n= número de individuos medidos, TBL= longitud del cuerpo, MBW= anchura máxima del cuerpo, EP= Distancia región anterior-poro excretor, NR= distancia región anterior-anillo nervioso), ES= longitud del esófago, TL= longitud de la cola, ABW= diámetro cuerpo-región anal, SpL= longitud de la espícula, GuL= longitud del gubernáculo, FL= núm. de costillas del campo lateral.

2.4. DIAGNOSIS Y RELACIÓN CON OTROS AISLADOS

Los tres aislamientos de *Steinernema* obtenidos en Veracruz; se compararon entre sí, tomando como base la descripción del aislamiento MTB. Las diferencias más relevantes se observaron en el aislamiento P7, que mostró variación en la cabeza de las espículas y en el arreglo de la fórmula de campos laterales (2, 4, 5, 6, 8, 6, 5,4, 2). No obstante a pesar de estas diferencias, los datos morfométricos mostraron una similitud entre los aislados por lo que se consideró que estos pertenecen a una misma especie. Las medidas de los tres aislamientos (MTB, P9 y P7) fueron sumadas, sacando el error estándar y el promedio máximo y mínimo para cada una de las características de importancia taxonómica (Cuadro 4), valores que se compararon con otras especies dentro del género *Steinernema*.

Diagnosis: *Steinernema* sp. (MTB - P7 - P9) se caracteriza por la presencia de estructuras en forma de cuernos en el extremo anterior de los juveniles infectivos. Puede ser reconocida por la longitud del cuerpo de los JI $581.3 \mu\text{m}$ ($524.2 - 692.4 \mu\text{m}$), EP = $46.1 \mu\text{m} \pm 5$ ($41.4 - 51.5 \mu\text{m}$); ES = $63.2 \mu\text{m} \pm 3.9$ ($56 - 69.5 \mu\text{m}$); TL = $58.6 \mu\text{m} \pm 3.8$; D% = 73; E% = $78.7 \mu\text{m}$ (Cuadro 3). La fórmula de los campos laterales corresponde a 2, 4, 5, 8, 7, 5, 4, 2. *Steinernema* sp. también se caracteriza por la presencia de machos y hembras con terminación anterior en forma de botella y por la presencia de 12 pares de papilas genitales. Machos de la primera generación con espículas $68.6 \pm 8.1 \mu\text{m}$ de longitud, con velo; Gubernáculo $45.6 \pm 7 \mu\text{m}$, con cabezuela variable; EP = $75.4 \pm 4.4 \mu\text{m}$, D% = 54.1 y GS% = $68 \mu\text{m}$. Las hembras se caracterizan por la presencia de la vulva en la región media en forma de una hendidura, y presencia de mucrón en el extremo de la cola.

Steinernema sp. comparte el carácter sinapomórfico (carácter derivado compartido por el grupo) (Nguyen & Adams, 2003) como proyecciones tipo cuernos en la región cefálica de los JI, con las diferentes especies del grupo o clade IV (Spiridonov *et al.*, 2004): *S. ceratophorum* (Jian *et al.*, 1997), *S. riobrave* (Cabanillas *et al.*, 1994. Nguyen & Adams, 2003), *S. bicornutum* (Tallosi *et al.*, 1995), *S. abbasi* (Elawad *et al.*, 1997. Nguyen & Adams, 2003), *S. pakistanense* (Shahina *et al.*, 2001, Stock *et al.*, 2001).

Steinernema sp. (MTB- P7-P9) difieren de otras especies en este grupo por la longitud del cuerpo de los JI con 591.7 μm , comparada con > 692 ó < 500 en otras especies y el valor D% de 73 comparada con ≥ 53 en otras especies, así como el valor E% de 78.7 (comparado a ≥ 105 en otras especies). La fórmula de campos laterales en los JI es similar a *S. riobrave* y al resto de las especies del grupo *bicornutum-ceratophorum-riobrave* (Grupo IV), pero no siendo así con *S. bicornutum* teniendo sólo 6.

Steinernema sp. procedente de Veracruz, México presenta una alta similitud morfométrica con la especie *S. riobrave* (Cabanillas *et al.*, 1994, Nguyen & Adams, 2003). Estas especies comparten la presencia de estructuras en forma de cuernos en la región cefálica de los juveniles infectivos, carácter que de acuerdo a datos morfológicos se considera como un carácter compartido - derivado de un ancestro común (Stock *et al.*, 2001). *Steinernema* sp. (MTB-P7-P9), además presenta la región cefálica terminada en forma de botella, carácter que podría considerarse desde un punto de vista filogenético como una característica autapomórfica (carácter único derivado), ya que no ha sido reportado para otras especies del género *Steinernema*, y que podría servir como un carácter para separar esta especie de otras (Stock, 2002).

Además de los caracteres morfológicos es conveniente considerar otras características de las especies. Por ejemplo, las especies hermanas no muestran una relación obvia del sitio geográfico donde fueron aislados (Stock *et al.*, 2001). *S. riobravis* colectada en Texas (Cabanillas, *et al.*, 1994), era considerada como la única raza conocida (Nguyen *et al.*, 2007). Sin embargo, en un muestreo realizado cerca de la localidad tipo Weslaco, Texas se encontraron diez nuevas razas, en huertas de nogal, campos de sorgo y de maíz y en un canal de irrigación, tres de estos aislados se colectaron en sorgo en Reynosa, México. Estos nuevos aislados se caracterizan por su mayor virulencia contra *Diaprepes abbreviatus* (L), comparado con *S. riobrave* raza comercial (Bio Vector 355) (Stuart *et al.*, 2004). Los datos obtenidos del muestreo en Reynosa, Tamaulipas y en Veracruz, constituyen una evidencia del probable origen de *S. riobrave*. Sin embargo se requiere de un muestreo más exhaustivo que permita conocer la distribución geográfica de *S. riobrave* y su rango de hospederos.

El estudio morfológico y morfométrico permitió agrupar los tres aislamientos colectados en las dos localidades de Veracruz, México como una especie, sin embargo la separación entre *Steinernema* sp. (MTB-P9-P7) y *S. riobrave* fue difícil llevar a cabo debido a la similitud entre los caracteres usados en la determinación taxonómica del género *Steinernema*. Para tratar de dilucidar la posición taxonómica de estos aislamientos se plantea la necesidad de realizar su identificación molecular.

Cuadro 3. Características morfométricas comparativas de juveniles infectivos, machos y hembras de cinco especies afines a *Steinernema* sp.

Carácter	<i>S. ceratophorum</i> (China) Jian <i>et al</i> , 1997	<i>S. riobrave</i> (Texas) Cabanillas <i>et al</i> , 1994, Nguyen & Adams, 2003, Nguyen <i>et al.</i> , 2007	<i>S. bicornutum</i> (Yugoslavia)* Tallosi <i>et al</i> , 1995	<i>S. abbasi</i> (Arabia) Elawad <i>et al</i> , 1997, Nguyen & Adams, 2003	<i>S. pakistanense</i> (Pakistán)* Shahina <i>et al</i> , 2001	<i>Steinernema</i> . sp MTP-7-9 (Veracruz, México)
Carácter único de cada especie	Dos estructuras en forma de cuerno en la región labial de los JI	Anchura del cuello del gubernáculo tan ancho como la parte posterior del corpus	Dos estructuras en forma de cuerno en la región labial de los JI	Mucrón ausente en el macho	Dos estructuras en forma de cuerno en la región labial de los JI; mucrón en 10% de los machos	Región anterior ♂ y ♀ de 1 y 2ª gen. en una proporción 1:3 en forma de botella
(Juveniles infectivos) Largo del cuerpo	706µm±62 (591-800)	622.0µm ±39.5 (561-701)	730µm ±52 (648-873)	541µm ±24 (496-579)	683µm ±21 (649-716)	591.7µm ±37.2 (532-692)
Formula de campos laterales	6 a 8	2,7,8,6,2	6	2,6,8,7,6,2	7 a 8	2, 4, 5, 6, 8, 6, 5, 4, 2.
Presencia de cuernos en la región labial de JI	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes
Terminación de la cola	Conoide, terminación en punta	Ventralmente curvada y terminación en punta	Conoide, terminación en punta	Alargada, dorsalmente curvada, con una depresión ventral en la punta	Conoide, terminación en punta	Conoide, terminación en punta
Fasmidio presente o ausente	No indica	Presente	No indica	Presente	Ausentes	Presente
(Machos 1ª gen.) Largo del cuerpo	1300µm ±134 (1100-1600)	1700µm ±0.09 (1500-1900)	1300µm ±150 (900-1005)	1200µm ±189 (900-1500)	1300µm ±89 (1200-1500)	1753.4µm ±143.3 (1585-2078)
Numero de papilas genitales	22 papilas y 1 independiente	24 papilas y 1 independiente	22 y una independiente	22 papilas y 1 precloacal independiente	22 papilas y 1 independiente	24 papilas y 1 independiente

Con o sin mucrón al final de la cola	Sin mucrón	Sin mucrón	Sin mucrón	Sin mucrón	Mucrón en 10% de los machos	Sin mucrón
Longitud de las espículas	71µm ±7 (54-90)	66.9µm ±4.2 (62.5-75.0)	48µm ±3.5 (38-50)	65µm ±5.70 (57-74)	68µm ±3.6 (62-73)	68.6µm ±8.1 (56.9-69.3)
Presencia o ausencia de velum	Con velum	Con velum	Con velum	Con velum	Con velum	Con velum
(Hembras 1ª gen.) Largo del cuerpo	5300µm ±1593 (2700-11800)	6500µm ±1.6 (3700-8300)	>10000µm	10700µm ±2197 (800-13700)	No indica	8213µm ±1159.2 (6710-10296)
Epitigma	Sin epitigma	Sin epitigma	No indica	Con epitigma	Con epitigma	Sin epitigma
Mucrón al final de la cola	Con mucrón	Con una ligera proyección, segunda generación con colas alargadas	Con un pequeño mucrón	65% de la anchura del cuerpo anal tiene un engrosamiento ventral postanal	Con una ligera proyección en forma de mucrón	Con una ligera proyección en forma de mucrón

Los rangos mínimos y máximos de las medidas (µm) que se encuentran en la tabla son dados en el paréntesis, así como en la parte superior se ha colocado la media ± DS (desviación estándar).

(*Datos tomados de la página de internet de Nguyen: <http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/kbnstein.htm>.)

Cuadro 4. Morfométrica de diferentes estadios de *Steinernema* sp. agrupando los tres aislamientos encontrados (MTB+P9+P7).

Carácter	Primera generación		Segunda generación		Juveniles infectivos
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	
N	39	30	36	30	120
TBL	1753.4±143.3 (1585.9-2078.6)	8213.6±1159.2 (6710-10296)	1425.4±96 (1312.4-1562)	4439.6±602.8 (3600-5446.6)	591.7±37.2 (532.6-692.4)
MBW	177.9±21.3 (91.6-154)	287.6±26.4 (273.3-343.3)	113.4±18.1 (86.2-144.8)	193.3±20.1 (163.3-223.3)	26.5±2 (22.6-30.9)
EP	75.4±14.4 (54.2-96.2)	95.3±10.7 (79.2-113.7)	79.3±9.3 (63.7-94.4)	81.6±9.8 (70.3-99.2)	46.1±5.5 (41.4-51.5)
NR	127.9±13.7 (85.4-125.4)	141.5±14.2 (124.7-165.9)	114.1±10.2 (95-128.3)	120.4±8.6 (107-133.5)	53.8±2.6 (48-59)
ES	138.6±20.8 (105.6-161.6)	197.3±21 (176-239)	144.9±11.3 (121.2-160.5)	166.7±13.2 (143.4-184.8)	63.2±3.9 (56-69.4)
TL	30±4.4 (22.2-35)	66.8±12.1 (53.4-90.3)	29.1±2.4 (26.6-33.4)	55.2±6.7 (47.9-68.2)	58.6±3.8 (51-69.5)
ABW	51.9±6.4 (44-59.3)	92.7±14.1 (77.7-116.8)	52.3±4 (46.6-57)	71.3±10 (55.8-86.1)	15±0.8 (13.3-17.2)
SpL	68.6±8.1 (56.9-69.3)		70.2±6.2 (62.4-76.8)		
GuL	45.6±7 (32.2-53.5)		47.1±4 (38.7-53.5)		
a=TBL/MBW	13	28.6	12.5	23	22.3
b=TBL/ES	12.8	41.6	9.8	26.6	9.3
c = TBL/TL	60.8	123.5	49	80.3	10.3
D%= EP/ESx100	54.1	50.3	54.5	49	73
E%= EP/TLx100	255.7	142.9	272.3	147.7	78.7
SW= SpL/ABWx100	130		130		
GS= GuL/SpLx100	60		60		
FL					2,4,5,6,8,6,5,4,2

Los rangos máximos y mínimos de las medidas (μm) son dados en el paréntesis, así como en la parte superior se encuentra la media±DS. Abreviaturas: n= número de individuos medidos, TBL= longitud del cuerpo, MBW= anchura máxima del cuerpo, EP= Distancia región anterior-poro excretor, NR= distancia región anterior-anillo nervioso, ES= longitud del esófago, TL= longitud de la cola, ABW= diámetro cuerpo-región anal, SpL= longitud de la espícula, GuL= longitud del gubernáculo, FL= núm. de costillas del campo lateral.

2.5. LITERATURA CITADA

Cabanillas H. Enrique, George O. Poinar Jr. y Jimmy R. Raulston. 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. *Fundamental and Applied Nematology*. 17: 2, 123-131.

Elawad S. Wasim Ahmad y Alex P. Reid. 1997. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. *Fundamental and Applied Nematology*. 20: 5, 435-442.

Franco, N. F., V. I. Cid del Prado y A. R. Lamothe. 2000. *Globodera bravoae* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) from Mexico. *International Journal of Nematology* 10:169-176.

Gaugler, Randy. 2002. *Entomopathogenic Nematology*. Department of Entomology. Rutgers University; New Jersey, USA. CABI Publishing, ISBN 0 85199 567 5. Pp. 1-5.

Gaugler R. y H. K. Kaya. 1990. *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, FL. USA. ISBN 0-8493-4541-3. Pp 9-11.

Georgis, R. y R. Gaugler. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*. 84:713-20.

Hernández Rosas, F., N. Isabel Ventura Benítez, Ma. Ruth Pérez Fernández y N. Real Luna. 2007. Manejo sustentable del agroecosistema caña de azúcar: Caso barrenador del

tallo en Paso del Macho, Veracruz. XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio del IOBC, Mérida, Yucatán.

Jian H., A. P. Reid y D. J. Hunt. 1997. *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from north-east China. *Systematic Parasitology* 37: 115–125.

Legaspi C. Jesusa, Benjamín C. Legaspi, Jr., y Robert R. Saldaña. 2000. Evaluation of *Steinernema riobravis* (Nematoda; Steinernematidae) against the Mexican Rice Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal Entomological Science*. 35:2, 141-149

Legaspi C. Jesusa, Benjamín C. Legaspi, Jr., Edgard G. King, y Robert R. Saldaña. 1997. Mexican Rice Borer, *Eoreuma loftini* (Lepidoptera:Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley: Its History and Control. *Subtropical Plant Science*, 49: 53-64

Nguyen Khuong B. y G. C. Smart Jr. 1993. Location of the Phasmids on Infective Juveniles of *Steinernema glaseri*. *Journal of Nematology* 25:4, 625-627.

Nguyen Khuong B. y G. C. Smart Jr., 1995. Morphometrics of Infective Juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology* 27:2, 206-212.

Nguyen Khuong B. & Adams Byron J. 2003. SEM and systematic studies of *Steinernema abbasi* Elawad et al., 1997, and *S. riobrave* Cabanillas et al., 1994 (Rhabditida: Steinernematidae). *Zootaxa* 179: 1-10.

Nguyen, K. B., Shapiro-Ilan, D. I., Stuart, R. J., McCoy, C.W., James, R. R., Adams, B.J., 2004. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Heterorhabditidae: Rhabditida) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology* 6, 231–244.

Nguyen, K. B. 2006. Direct Submission. Submitted (03-JUL-2006) *Entomology & Nematology*, University of Florida, Natural Area Dr, Gainesville, FL 32611-0620, USA.

*Nguyen Khuong B. 2006. Morphology and Taxonomy of Entomopathogenic nematodes. <http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/kbnstein.htm>.

Nguyen K. B., D.J. Hunt y Zdenek Mracek. 2007. Capítulo 4. Steinernematidae. Species descriptions. Pp 467- 477. En Nguyen K. B., y D.J. Hunt (Ed.). *Entomopathogenic nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. *Nematology Monographs and Perspectives*. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands.

Nguyen, K. B.; Stuart, R. J.; Andalo V.; Gozel U. y Rogers, M. E. 2007. *Steinernema texanum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Texas, USA. *Nematology*, 9: 3, 379-396.

Qiu L., Y. Fang., Y. Zhou, Y. Pang y B. K Nguyen. 2004. *Steinernema guangdongense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from sothern China with a note on *S. serratum* (nomen nudum). *Zootaxa* 704: 1-20.

Phan L. K., A. S. Subbotin Nguyen C. N. y M. Moens 2003. *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology*, 5:3, 367-382.

Ring, R. Dennis y H.W. Browning. 1990. Evaluation of Entomopathogenic nematodes against the Mexican Rice Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Nematology* 22:3, 420-422.

Seinhorts, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4, 67-69.

Shahina F., M. Anis., A.P. Ried., J.Rowe, & M. A. Maqbool, 2001 *Steinernema pakistanense* sp. n. (Rhabditidae Steinernematidae) from Pakistan. *International Journal of Nematology*. 11: 124-133.

Spiridonov, Sergie E., Alex P. Reid, Kasia Podrucka, Sergie A. Subbotin y Maurice Moens. 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features. *Nematology*, 6: 4, 547-566.

Stock, S. Patricia. 2002. New Trends in Entomopathogenic Nematode Systematics: Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction. Vancouver, Canada; The Tenth International Congress of Parasitology.

Stock, S. Patricia, Campbell, James, F. y Nadler, Steven, A. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) Inferred From Ribosomal DNA Sequences and Morphological Characters. *Journal of Parasitology* 87:4, 877–889.

Sturhan D. y Z. Mracek 2000. Comparison of the *Galleria* baiting technique and a direct extraction method for recovering *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) infective-stage juveniles from soil. *Folia Parasitologica* 47: 315-318.

Tallosi, B., A. Peters y R. Ehlers 1995. *Steinernema bicornutum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vojvodina, Yugoslavia. *Russian Journal of Nematology*. 3: 2, 71-80.

White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode from cultures. *Science* 66, 302-303.

Wilcox, D., B. Dove, D. McDavis & D. Greer. 2002. UTHSCSA Image Tool for Windows ver. 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio. U.S.A.

Woodring L. Jennifer y H.K. Kaya K. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Fayetteville, Arkansas, USA. 1–29.

CAPITULO 3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS DE DOS ÁREAS CAÑERAS, EN VERACRUZ, MÉXICO

La identificación de las especies es uno de los principios básicos en la biología, la información de datos moleculares con este propósito son cada vez más comunes para generar información sobre las especies y la diversidad de los organismos. La identificación de especies de nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* se ha realizado usando diferentes secuencias de nucleótidos del rDNA por ejemplo, el ITS y D2D3 (Mráček *et al.*, 2009). Las secuencias del gen ribosomal 18S rDNA (Blaxter *et al.*, 1998) son generalmente utilizadas para evaluar relaciones filogenéticas entre especies de *Steinernema*. Mientras el gen ribosomal 28S (LSU), ITS y mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 4 (ND4), citocromo oxidasa I (Cox 1) y el gen mitocondrial ribosomal (16S) han sido utilizados para reconstruir las relaciones filogenéticas entre nematodos entomopatógenos (NEP) (Adams *et al.* 2007; Adams, 1998; Nadler *et al.*, 2006; Nadler *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009). Sin embargo, la región ITS es una con mayor uso para la determinación específica de nematodos (Spiridonov *et al.*, 2004 y Mráček *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2009; Powers 2004). De igual manera la región del 18S, ha sido incorporado en estudios de biodiversidad de nematodos (Hatting *et al.*, 2009). Spiridonov *et al.* (2004) realizaron la reconstrucción de la filogenia de *Steinernema* con secuencias de la región ITS. Este trabajo ha servido de base para muchos otros trabajos taxonómicos de este género. Considerando lo anterior, dado que la información acerca de la determinación taxonómica molecular de especies de nematodos nativos de México, es prácticamente inexistente, se desarrolló el presente estudio, para

tratar de determinar a nivel de especie mediante la secuenciación de la región ITS, aislados de nematodos entomopatógenos obtenidos a través de insectos cebo de campos cañeros del Municipio de Paso del Macho, Ver.

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2. DETERMINACIÓN MOLECULAR

3.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS

La extracción de DNA se realizó a partir de 19.7 ± 1 mg de juveniles infectivos (JI) liofilizados de los tres aislamientos (MTB, P7 y P9). La extracción se realizó con el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, con buffer TBE al 1X a 100 volts por 25 minutos. Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio y la presencia de ADN se registró con un fotodocumentador Gene Wizard. Posteriormente, se amplificó la región de los ITS que incluyen la región conservada del 5.8S mediante los iniciadores (primers) TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') (Joyce *et al.*, 1994) sentido (Pf) y AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Howlett *et al.*, 1992) contrasentido (Pr) que amplifican aproximadamente 927 pb de la fracción 18Sr ADN (parcial 3') ITS₁, 5.8S, ITS₂ y 28S (parcial 5'), dichos iniciadores han sido utilizados por varios autores (Spiridonov *et al.*, 2004; Skantar *et al.*, 2007, Eustachio

et al., 2008). Las reacciones de PCR se realizaron en tubos Eppendorf de 0.2mL en un volumen total de 25 μ L. Cada reacción contenía 0.2 μ M de cada primer, 150 μ M de cada dNTP (Promega), 0.5 unidades de Taq polimerasa (Promega) en buffer de reacción 1x y 2 μ l de ADN. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador MyCycler (BIO-RAD), donde las condiciones de reacción fueron denaturalización por 2 min a 94 °C durante 30 seg alineación a 60 °C por 60 seg y extensión a 72 °C por 30 seg, con una extensión final a 72 °C durante 5min. La amplificación en todos los casos se corroboró mediante electroforesis siguiendo el procedimiento de visualización mencionado anteriormente dentro del proceso de extracción de ADN. La limpieza del producto de PCR se realizó con el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto amplificado se envió a la compañía Macrogen (Korea) para su secuenciación. La secuenciación se realizó en ambos sentidos con los iniciadores empleados para la amplificación inicial.

3.2.2. ANALISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias que se obtuvieron se alinearon con el programa ClustalW implementado en el programa MEGA4.1 (Kumar, 2008) y se compararon con las secuencias existentes en el banco de genes NCBI a través del BLAST (Zheng *et al.*, 2000). Con el propósito de ubicar mediante técnicas moleculares a qué grupo filogenético pertenece el nematodo entomopatógeno aislado de Veracruz se obtuvieron 22 secuencias del género *Steinernema* a partir de estudios morfológicos moleculares previos que han utilizado esta misma región (Spiridonov *et al.*, 2004), que corresponden a 16 especies ubicadas en diferentes grupos del

género de *Steinernema*. Las secuencias obtenidas corresponden a: *S. riobrave* DQ835613.1, GU174000, *S. ceratophorus* AY230165.1, AF4407651 *S. pakistanense* AY230181.1, *S. bicornutum* AY230172, *S. abbasi* AY230158.1, *S. longicaudum* AY230177, *S. krausei* AY230176, AY171258.1, *S. feltiae* AY171246.1, DQ310469, *S. arenarium* AY230160.1, DQ314288.1, *S. oregonense* AY230180.1, *S. diaprepesi* AF122021.1, GU173995.1, *S. kari* AY230173.1, *S. rarum* DQ221117.1, *S. cubanum*, AY230166.1 *S. carpocapsae* AY230164.1, *S. intermedium* AY230172.

La reconstrucción de la filogenia se realizó con todas las secuencias con el método distancias genéticas, con el algoritmo de Neighbor Joining y el modelo de sustitución de Tamura Nei, en parsimonia, con la opción de la búsqueda de árboles de intercambio de ramas entre vecinos (CNI) en el programa MEGA4.1 y con estadística Bayesiana con modelos iniciales de nucleótidos 4x4, con un modelo de cambio entre bases GTR y soporte de ramas con 100,000 generaciones en mcmc implementado en MrBayes ([Huesenbeck y Ronquist, 2001](#)).

Posteriormente, empleando las 12 secuencias con mayor similitud de nucleótidos, se reconstruyó la filogenia del grupo IV empleando únicamente la región conservada del fragmento 5.8S. Las secuencias nuevamente se alinearon y se obtuvo la matriz de distancias genéticas entre pares de secuencias, con base en el modelo de sustitución de nucleótidos Tamura Nei, las distancias se obtuvieron entre pares de secuencias que tiene sitios similares, es decir que todas las posiciones que contienen espacios entre el par de secuencias comparadas, así como los datos perdidos fueron eliminados (eliminación por pares).

El análisis de filogenia se realizó con diferentes aproximaciones como: distancias genéticas, parsimonia y estadística bayesiana; con máxima parsimonia en el programa MEGA4.1 con el método de búsqueda CNI con 500 repeticiones en la prueba de bootstrap, de donde resultaron 36 árboles posibles de los cuales se hizo un árbol de consenso con 50% de probabilidad.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un total de 6 secuencias, dos de cada aislamiento de la región ITS, que corresponden a 3 aislamientos, donde la longitud de la región ITS = 826 - 842 pares de bases (pb). La alineación de las secuencias señala que no existe variación entre los tres aislados (MTB, P7 y P9) (Cuadro 5) por lo que en análisis posteriores se empleó la secuencia consenso obtenida a partir de la información de los tres aislamientos. La comparación de las secuencias resultante con la base de datos de NCBI, señala un alto nivel de similitud con el género *Steinernema* y en particular una mayor cercanía con *S. riobrave* y *S. ceratophorum*, con cobertura e identidad de 91% y 85 con la primera, y 65% y 100 con la segunda.

La reconstrucción de la filogenia con las 16 especies seleccionadas de *Steinernema* seleccionadas ubica a los nuevos aislados de este estudio dentro del grupo IV propuesto por (Spiridonov *et al.*, 2004) (Figura 13), con un 99% de probabilidad en el análisis de bootstrap, con 500 repeticiones. Las 8 especies del grupo *bicornutum-ceratophorum-riobrave* (Spiridonov *et al.*, 2004), forman un ensamble monofilético. El nuevo aislado se agrupa con

S. riobrave, resultado que coincide con el obtenido en el estudio de morfometría de este grupo.

Cuadro 5. Comparación entre nucleótidos de los tres aislados de *Steinernema* sp. (P9, P7 y MTB), señalando que no hay variabilidad entre ellos.

P9	ACAAGCTTTGTCGGTGGATCACTTGGTTCGTAGATCGATGAAGAACGGGGCAA	[54]
P7	ACAAGCTTTGTCGGTGGATCACTTGGTTCGTAGATCGATGAAGAACGGGGCAA	[54]
MTB	ACAAGCTTTGTCGGTGGATCACTTGGTTCGTAGATCGATGAAGAACGGGGCAA	[54]
P9	AACCGTTATATAGCGTGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAATTTTGAACGCA	[108]
P7	AACCGTTATATAGCGTGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAATTTTGAACGCA	[108]
MTB	AACCGTTATATAGCGTGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAATTTTGAACGCA	[108]
P9	AATGGCACTAACAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCGAT	[158]
P7	AATGGCACTAACAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCGAT	[158]
MTB	AATGGCACTAACAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCGAT	[158]

La región conservada 5.8S señala que la diferencia entre *S. bicornutum* y *S. ceratophorum* es de 69 pares de bases y *Steinernema* sp con *S riobrave* presenta 93pb y la separación de estas con el resto grupo IV varía entre 69-151 pares de bases, lo cual indica una diferencia entre *S riobrave* y *Steinernema* sp. (Cuadro 6). Tomando en cuenta las observaciones de [Nadler et al., \(2006\)](#) quienes señalan que el análisis de la filogenia de *Steinernema* basado en la región de los ITS, presenta problemas debido al alto nivel de variación que existe en esta región, lo cual impide encontrar regiones homologas durante el alineamiento; se realizó la reconstrucción de la filogenia del grupo IV mediante el análisis de la región conservada del 5.8S (Cuadro 7).

Este análisis permitió separar el grupo IV en dos grupos (IV-a (*Steinernema* sp. y *S. riobrave*) y IV-b (*S. abbasi*, *S. bicornutum* y *S. ceratophorum*), el IV-a tiene un soporte de ramas 100% de probabilidad de que sea correcto y el grupo IV-b con 76%; dentro del

primer grupo se ubica la especie *S. riobrave* y el aislamiento de Veracruz que a su vez son separados con un soporte de ramas de 100% (Figura 14), lo que nos indica que aun cuando estas especies están emparentadas podrían no tratarse de una misma especie; caso contrario se observa en el grupo IV-b en donde en esta región se agrupan dos especies, que a su vez son separadas con el análisis de todo el fragmento 5.8S. Por lo que podemos señalar que este fragmento podría ser una herramienta útil para separar especies relacionadas. Estos resultados permiten señalar que la especie aislada corresponde al grupo IV propuesto en la clasificación de [Spiridonov et al., \(2004\)](#) basada en la región de los ITS así como en la región conservada 5.8S y que *S. riobrave* es una especie emparentada con este nuevo aislado, sin embargo, en este momento no hay secuencias que tengan un 100% de similitud con el aislamiento y segmento analizado, por lo que se puede pensar que bien podría tratarse de una especie diferente; [Stock et al., \(2001\)](#) mencionan que la relación filogenética resultantes de la combinación de caracteres morfológicos y secuencias moleculares usando (LSU) rADN puede ayudar a delimitar especies, estos resultados a su vez soportan datos morfológicos de este grupo que corroboran la posición filogenética señalada por la región de los ITS, y la estrecha cercanía con *S. riobrave*, ya que esta evidencia de combinaciones (morfología + datos moleculares) de acuerdo a [Stock \(2002\)](#) representa un mejor trabajo de historia evolutiva.

El análisis molecular soporta los resultados de la morfometría de este grupo ([Stock et al., 2001](#); [Stock, 2002](#)), sin embargo los ejemplares estudiados no correspondieron con las especies descritas en la clave ([Nguyen, 2007](#)) por lo que se utilizó la información de los ITS para ubicar taxonómicamente los ejemplares aislados, seleccionándose las especies

más cercanas con base al mayor número de nucleótidos en común encontradas en el GenBank (Nguyen, 2004; Gaugler, 2002; Stock, 2001) que corresponden a las especies *S. riobrave*, *S. ceratophorum*, *S. bicornutum*, *S. abbasi*, *S. pakistanense*.

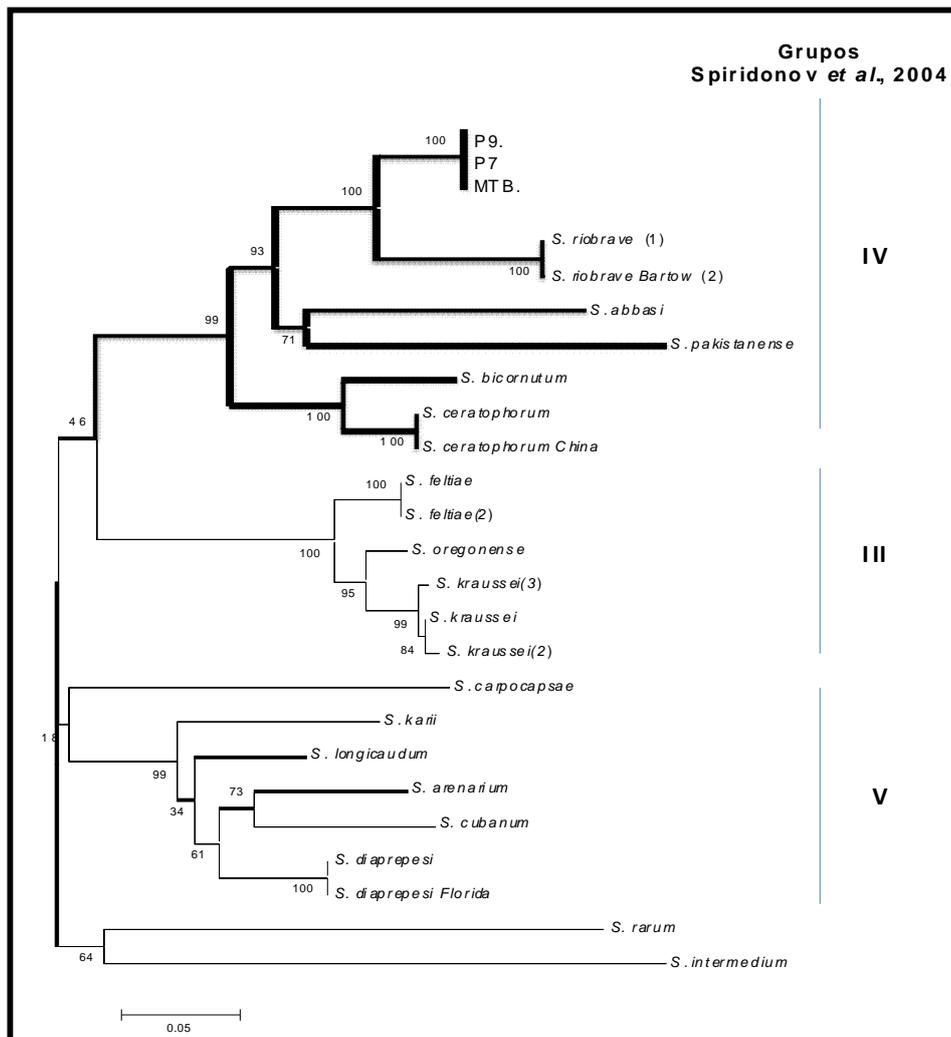


Figura 13. Dendrograma construido con las secuencias de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2 de rDNA), con base en el método de Neighbor-Joining. Los números en cada rama del dendrograma representan los valores “bootstrap”. El dendrograma está realizado a escala con el largo de ramas es igual a la distancia evolutiva. Las distancias evolutivas se realizaron con el método de Tamura-Nei y están en base al número de sustituciones por sitio. Todas las posiciones que contienen espacios en el alineamiento o datos perdidos fueron eliminadas.

En conjunto el análisis de distancias genéticas y filogenético, mediante el método de Neighborn-Joining, señalan que los aislados empleados en esta investigación se ubican en el grupo IV (*bicornutum-ceratophorum-riobrave* (Spiridonov *et al.*, 2004)) (Figura 1) con un soporte de ramas para la división entre *S. riobrave* y los aislamientos de Veracruz del 100%, y la rama de todo el grupo IV con un 99% (Figura 13).

Cuadro 6. Matriz de la estimación de divergencias evolutivas de 12 especies de *Steinernema* basados en el análisis de los ITS r ADN. La diferencia en el número de bases entre secuencias es señalada. Todas las posiciones que contienen espacios o datos perdidos fueron eliminadas, el total de sitios analizado fue de 596 posiciones en el programa MEGA 4.

Especie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1											
2 P9	0.0										
3 P7	0.0	0.0									
4 MTB	0.0	0.0	0.0								
5 <i>S. riobrave</i> (1)	128.0	128.0	86.0	93.0							
6 <i>S. riobrave</i> (2)	128.0	128.0	86.0	93.0	4.0						
7 <i>S. ceratophorum</i> (1)	187.0	187.0	146.0	152.0	158.0	153.0					
8 <i>S. ceratophorum</i> (2)	186.0	186.0	146.0	152.0	158.0	153.0	0.0				
9 <i>S. bicornutum</i>	198.0	198.0	157.0	163.0	168.0	162.0	69.0	69.0			
10 <i>S. abbasi</i>	203.0	203.0	161.0	167.0	187.0	184.0	166.0	166.0	184.0		
11 <i>S. pakistanense</i>	239.0	239.0	200.0	206.0	212.0	214.0	188.0	188.0	207.0	208.0	
12 <i>S. intermedium</i>	292.0	292.0	252.0	258.0	271.0	267.0	268.0	268.0	286.0	279.0	301.0

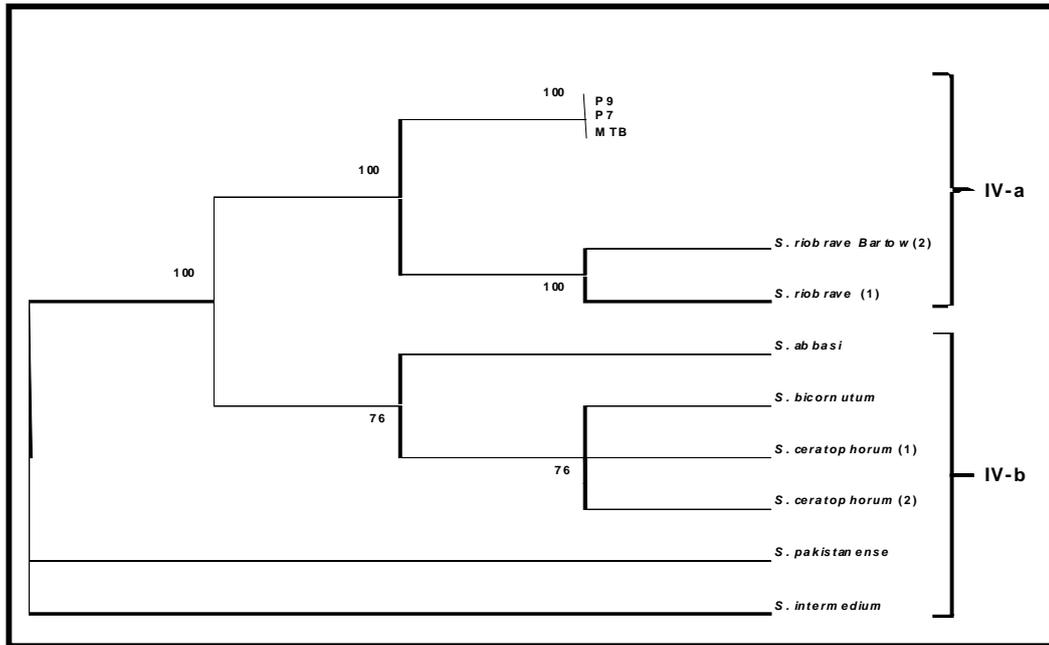


Figura 14. Historia evolutiva inferida con Máxima Parsimonia de la región del gen 5.8S del grupo IV de género *Steinernema*. El árbol corresponde árbol de consenso con el 50% de probabilidad de 39 árboles posibles. La reconstrucción del árbol se realizó con el algoritmo de Close-Neighbor-Interchange con adición de secuencias al azar con 10 repeticiones. Los sitios con espacios o datos perdidos fueron eliminados. El análisis se realizó con 157 de los cuales 14 fueron informativos para parsimonia, el análisis se realizó en MEGA4.

Cuadro 7. Posición de los nucleótidos de la región conservada (5.8S) *Steinernema* sp. (P9, P7 y MTB) y la variabilidad encontrada de nucleótidos de otras especies del género *Steinernema* pertenecientes al grupo IV propuesto por Spiridonov et al., (2004).

<i>Steinernema</i> sp.	ACAAGTCTTGTCTGGTGGATCACTTGGTTCTAGATCGATGAAGAACGGGGCAA	[54]
<i>S. riobrave</i>A.T.....	[54]
<i>S. riobrave1</i>A.T.....	[54]
<i>S. ceratophorum</i>A.....C.....	[54]
<i>S. ceratophorum1</i>A.....C.....	[54]
<i>S. bicornutum</i>A.....C.....	[54]
<i>S. pakistanense</i>A.A.....A.....A.G..	[54]
<i>S. abbasii</i>AC.....A.....T.G	[54]
<i>S. intermedium</i>A.....	[54]
<i>Steinernema</i> sp.	AACCGTTATATAGCGTGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAATTTGAACGCA	[108]
<i>S. riobrave</i>	.C.....GT.....G	[108]
<i>S. riobrave1</i>	.C.....GT.....G	[108]
<i>S. ceratophorum</i>T.....G.....	[108]
<i>S. ceratophorum1</i>T.....G.....	[108]
<i>S. bicornutum</i>C.....G.....	[108]
<i>S. pakistanense</i>C.....G.....G.....T..	[108]
<i>S. abbasii</i>G.....G.....	[108]
<i>S. intermedium</i>T.G.....T.....T.....T..	[108]
<i>Steinernema</i> sp.	AATGGCACTAACAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCGAT	[158]
<i>S. riobrave</i>T.....T..	[158]
<i>S. riobrave1</i>T.....T..	[158]
<i>S. ceratophorum</i>T.....C..T.....T..	[158]
<i>S. ceratophorum1</i>T.....C..T.....T..	[158]
<i>S. bicornutum</i>T.....T.....	[158]
<i>S. pakistanense</i>A.....C.....CTC.....	[158]
<i>S. abbasii</i>C.....CRC.T.....T..	[158]
<i>S. intermedium</i>C.....C.....G.....TGG.....	[158]

Las evidencias señaladas hasta el momento basadas en la secuencia de nucleótidos de la región de los ITS y en particular del 5.8S, así como de los caracteres morfológicos, permiten señalar que los tres aislados de nematodos de suelos cañeros del Municipio Paso del Macho, Veracruz, son una misma especie, resultados que fueron confirmados por Stock (2011) (comunicación personal), los cuales presentan similitud con *S. riobrave*. Sin embargo para obtener un análisis filogenético más robusto, se considera importante examinar otras secuencias, 28S rADN, regiones D2D3, además de la región ITS (Nguyen *et al.*, 2001; Stock *et al.*, 2001). La secuencia del 28S permite evaluar las relaciones filogenéticas entre especies de *Steinernema* además de ser importante para interpretar las relaciones evolutivas y con propósito de diagnóstico. El uso de una región común para la identificación permitirá en un futuro poder clasificar las especies de nematodos de una forma más rápida y precisa. De este estudio se concluye la necesidad de confirmar el estatus taxonómico de la especie bajo estudio, mediante la obtención de secuencias adicionales provenientes de otros genes y regiones de ITS, y así corroborar que el aislado (MTB-P7-P9) corresponde a *S. riobrave* o no.

3.4. LITERATURA CITADA

Adams, B.J. 1998. Species concepts and the evolutionary paradigm in modern nematology. *Journal of Nematology* 30: 1-21.

Adams, B.J., A. Fodor, H.S. Koppenhofer., E. Stackebrandt., S.P. Stock, y M.G. Klein. 2006. Biodiversity and systematic of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37, 32-49.

Blaxter, M.L., P. De Ley., J.R.Garey., L.X., Scheldeman., P. A. Vierstraete., J.R.Vanfleteren., L.Y.Mackey., M. Dorris., L.M. Friesse., J.T. Vida., y W.K. Thomas, 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature (London)* 392, 71-75.

Eustachio T., Zdenek Mracek, Khuong B. Nguyen y Oreste Triggiani. 2008. *Steinernema ichnusae* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Sardinia Island (Italy). *Journal of Invertebrate Pathology*. 99: 173-185.

Gaugler R. 2002. *Entomopathogenic Nematology*. Department of Entomology, New Brunswick, New Jersey, USA. ISBN 0-85199-567-5. © CAB *International*.

Hatting J, P. Stock y Selçuk Hazir. 2009. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in South Africa. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102:2: 120-128.

Howlett, B. J., A. G. Brownlee., D. I. Guest., G. J. Adcock., y G. I. McFadden,. 1992. The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics* 22:455–461.

Huelsenbeck, J. P. y Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17:8, 754-5.

Joyce, S.A., A. Reid., F. Driver, & J. Curran, 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. Pp 178-187. *En* Burnell, A.M., Ehlers, R.-U. & Masson, J.-P. (Eds). *COST 812* Biotechnology: Genetics of entomopathogenic nematodes bacterium complexes. Proceedings of symposium and workshop, St Patrick's College, Maynooth, County Kildare, Ireland. Luxembourg, European Commission, DGXII.

Kumar S., Masatoshi Nei, Joel Dudley y Koichiro Tamura. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS*. 9: 4, 299-306.

Lee MM, M. Sicard., M. Skeie y S. P. Stock. 2009. *Steinernema boemarei* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern France. *Systematic Parasitology* 72:2,127-4.

Mráček, Z; L. Qi-Zhi y K. B. Nguyen. 2009. *Steinernema xueshanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Yunnan, southeast Tibetan Mts.,China. *Journal Invertebrate Pathology*. 102:1, 69-78.

Nadler, Steven A., E. Bolotin, & S. P. Stock,. 2006. Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Systematic Parasitology*, 63:161–181.

Nguyen, K.B., Shapiro-Ilan, D.I., Stuart, R.J., McCoy,C.W., James, R.R. y Adams, B.J. 2004. *Heterorhabditis mexicana* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology*, 6: 231-244.

Nguyen K. B., y D.J. Hunt y Zdenek Mracek. 2007. Chapter 4. Steinernematidae. Species descriptions. Vol 5. 467- 477pp. En Nguyen K. B., y D.J. Hunt (Ed.). *Entomopathogenic nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. *Nematology Monographs and Perspectives*. Koninklijke Brill NV,Leiden, The Netherlands..

Powers T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annual Review Phytopathology* 42:367-83.

Skantar A. M., Z. A. Handoo, L. K. Carta y D. J. Chitwood. 2007. Morphological and Molecular Identification of *Globodera pallida* Associated with Potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39(2):133–144.

Spiridonov, Sergie E., Alex P. Reid, Kasia Podrucka, Sergie A. Subbotin y Maurice Moens. 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features. *Nematology*, Vol. 6 :4, 547-566.

Stock, S. Patricia. 2002. *New Trends in Entomopathogenic Nematode Systematics: Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction*. Vancouver, Canada; The Tenth International Congress of Parasitology.

Stock, S. Patricia., James, F Campbell., y Steven, A. Nadler. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) Inferred From Ribosomal DNA Sequences and Morphological Characters. *Journal of Parasitology* 87:4, 877–889.

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner y Webb Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 2000; 7(1-2):203-14. BLASTN 2.2.2.2.

CAPITULO 4. ESTUDIOS DE INFECTIVIDAD Y VIRULENCIA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (MTB, P7 y P9).

Los nematodos entomopatógenos (NEP), de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* asociados en forma mutualística con la bacteria *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente, han sido desarrollados como bioinsecticidas contra diferentes plagas de insectos de importancia económica (Georgis y Manweiler, 1994). Los NEP presentan ventajas sobre los insecticidas químicos como son: no ser tóxicos para vertebrados, constituir una estrategia sostenible, ambientalmente amigables, poseer la habilidad de buscar a su insecto hospedero y reciclarse. La eficacia de los nematodos está estrechamente relacionada con el aislado o especie y con condiciones ambientales o técnicas de aplicación, por lo que no existen condiciones similares o comparables (Epsky y Capinera, 1993; Susurluk y Ehlers, 2008). Las diferencias en virulencia entre especies de nematodos incluyen más de un tipo de ensayo, tomando en cuenta la estrategia de búsqueda del nematodo por su insecto hospedero (Grewal *et al.*, 1994; Ricci *et al.*, 1996), así como su capacidad de penetración e infectividad. En el presente trabajo se pretende estudiar los atributos biológicos de los nematodos aislados de Veracruz (MTB-P7-P9) sobre larvas de *Diatraea saccharalis*, cuyos resultados apoyaran en un futuro el mejor uso de estos organismo en condiciones de campo.

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1. NEMATODOS

Steinernema sp fue aislado mediante el uso de larvas de *G. mellonella* como cebo a partir del suelo de áreas cañeras pertenecientes a la zona de abastecimiento del Ingenio Central Progreso, Municipio Paso del Macho, Ver., y propagados en larvas de ultimo instar de *G. mellonella* (Woodring y Kaya, 1988) a 25°C. Los juveniles infectivos (JI) obtenidos en trampas de White (White, 1927) a partir de larvas infectadas de *G. mellonella* fueron almacenados en agua destilada, en frascos de cultivo de tejidos de 250ml a temperatura ambiente (21-23°C).

4.1.2. INSECTOS

Larvas del último instar larval de *D. saccharalis* (Lepidóptera: Pyralidae), fueron obtenidas de la cría mantenida en el CIMMYT (Km. 45, Carretera Méx-Veracruz, El Batán, Texcoco, México) a través del apoyo del Dr. George Mahuku, del programa de Mejoramiento del maíz. En todos los bioensayos se usaron larvas de 3° o 4° instar, seleccionados de manera aleatoria.

4.1.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Para la caracterización biológica de los aislados de nematodos entomopatógenos, se realizaron cuatro experimentos donde se estudió la relación patogénica de estos con larvas de *D. saccharalis*. Los cuatro experimentos consistieron en la estimación de la virulencia, tiempo de exposición, capacidad de penetración y eficiencia en uso del hospedante (capacidad de propagación).

4.1.3.1. VIRULENCIA

El procedimiento fue el mismo para cada aislado. Para la estimación de la virulencia, diferentes grupos de larvas de último instar de *D. saccharalis* fueron expuestos a diferentes concentraciones de JI de cada aislado. Las concentraciones de JI fueron de 1, 10, 20, 50 y 100 JI por larva. La concentración de JI fue ajustada por diluciones volumétricas. El experimento se realizó en placas de cultivo de tejidos con 12 orificios (SARSTEDT), y en cada orificio se depositó la concentración de nematodos a evaluar, se empleó una placa por concentración. Para evitar la desecación de los nematodos, en cada orificio se colocaron dos círculos de papel filtro Whatman No. 4 humedecidos con 120 µl de agua destilada estéril. En la placa del tratamiento testigo, únicamente se depositó agua destilada estéril. En cada orificio de cada placa se colocó una larva de tercer instar de *D. saccharalis* más 3 g de dieta. Todas las placas fueron colocadas en una bolsa de plástico para mantener la humedad, e incubadas a 25 °C en oscuridad total. La mortalidad se registró cada 24 horas durante 5 días.

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, donde todos los tratamientos se realizaron el mismo día, y el experimento completo se repitió en tres ocasiones diferentes. Los datos se analizaron mediante análisis Probit, con el programa Genstat (8.0) (Payne *et al.*, 2005).

4.1.3.2. TIEMPO DE EXPOSICIÓN

El procedimiento fue el mismo para cada aislado de nematodos. Para este experimento, 200 JI contenidos en 120 µl de agua destilada estéril fueron colocados en cada una de las cavidades de seis placas de cultivo de tejidos. Posteriormente, en cada cavidad se colocó una larva de *D. saccharalis*. Media hora después, todas las larvas de cada una de las cajas seleccionadas al azar fueron retiradas, lavadas con agua destilada estéril y transferidas individualmente a otra placa conteniendo papel filtro estéril, humedecido y con 3g de dieta. Después de una hora, todas las larvas de otra caja seleccionada al azar fueron removidas y transferidas a otra placa como se describió anteriormente. Este procedimiento se repitió a las 3, 6, 9 y 12 h de exposición de las larvas a los JI con una placa diferente para cada tiempo de exposición. Todas las placas fueron incubadas a 25 °C ± 1. La mortalidad fue registrada únicamente a las 48h posteriores a la inoculación. Con los datos obtenidos, se estimó el tiempo de exposición requerido para lograr 50% de mortalidad.

El experimento se realizó con un diseño completamente al azar, donde todos los tratamientos fueron realizados el mismo día, y el experimento completo fue repetido en tres ocasiones diferentes. Los resultados se analizaron mediante regresión logística binaria con el programa GenStat 8.0 (Payne *et al.*, 2005).

4.1.3.3. CAPACIDAD DE PENETRACIÓN

El número de nematodos que penetraron en el hospedero es una medida usada para evaluar bioensayos de infectividad (Hominick y Reid, 1990; Caroli *et al.*, 1996). Se asume que el nematodo con la mayor eficacia para reducir un insecto plaga, mostrará la mayor eficiencia o habilidad de penetración. (Ricci *et al.*, 1996). En este ensayo una suspensión de 100 JI contenidas en 125 µl de agua destilada estéril por aislado, fue colocada en cada una de las cavidades de dos placas de cultivo de tejidos. La mortalidad se registró en la primera caja a las 48 h, y en la segunda placa a las 72 h. Las larvas muertas fueron lavadas para remover los nematodos de su superficie. Estas fueron transferidas a nuevas placas y se dejaron 2 días más para luego ser disectadas bajo un microscopio estereoscópico. Se contabilizó el número de NEP presentes en cada cadáver y se calculó mediante un concepto binomial (dentro-fuera) el porcentaje de JI que invadieron al hospedero (Glazer y Lewis, 2000).

El experimento se realizó con un diseño completamente al azar, donde todos los tratamientos fueron realizados el mismo día, y el experimento completo fue repetido en tres ocasiones diferentes. Los resultados se analizaron mediante regresión logística binaria con el programa GenStat 8.0 (Payne *et al.*, 2005).

4.1.3.4 EFICIENCIA DE USO DEL HOSPEDERO

Mediante la metodología y materiales descritos anteriormente, diferentes grupos de 12 larvas de *D. saccharalis* fueron expuestas en forma individual a 100 JI de los diferentes

aislados de nematodos. Las placas se incubaron a 23-25°C durante 10 a 12 días, periodo en el cual se colocaron en trampas blancas para colectar los JI.

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, donde todos los tratamientos se realizaron el mismo día y el experimento fue repetido en tres ocasiones diferentes. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (GenStat, Release 8.2), ya que los datos obtenidos cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. VIRULENCIA

No se encontraron diferencias significativas entre ordenadas al origen ($X^2_{39} = 1.98$, $P = 0.138$), ni las pendientes ($X^2_{39} = 0.35$, $P = 0.704$). Lo cual sugiere que no hay evidencia de que existan diferencias significativas en la virulencia de los aislados de nematodos hacia las larvas de *D. saccharalis*. La concentración letal 50 (LC_{50}) estimada para cada uno de los aislados se muestra en el Cuadro 8, incluyendo los límites de confianza inferiores y superiores. El número de juveniles infectivos que se requiere para obtener un 50% de mortalidad es de 2.9, 3.4 y 3.7 que corresponden a los aislados MTB, P7 y P9 respectivamente.

Cuadro 8. Aislamientos de *Steinernema* sp. mostrando la LC₅₀, los límites inferiores y superiores, la ordenada al origen y pendiente.

Aislamiento	LC 50	Límite inferior	Límite superior	Ordenada al origen	Pendiente
MTB	1.355	0.826	2.061	-0.378	1.413
P7	2.069	1.326	3.043	-0.378	1.413
P9	2.282	1.477	3.334	-0.378	1.413

4.2.2. TIEMPO DE EXPOSICIÓN

En el ensayo de tiempos de exposición no se encontraron diferencias entre aislamientos ($F_{2,36} = 2.41$, $P < 0.001$), pero si entre los diferentes tiempos de infección ($F_{5,36} = 78.91$, $P < 0.001$). No se encontró una interacción significativa entre estos factores ($F_{10,36} = 0.85$, $P < 0.001$). En todos los aislamientos se observó que la mortalidad se incrementa con el tiempo de exposición, lo cual es consistente para los tres aislamientos (Figura 15).

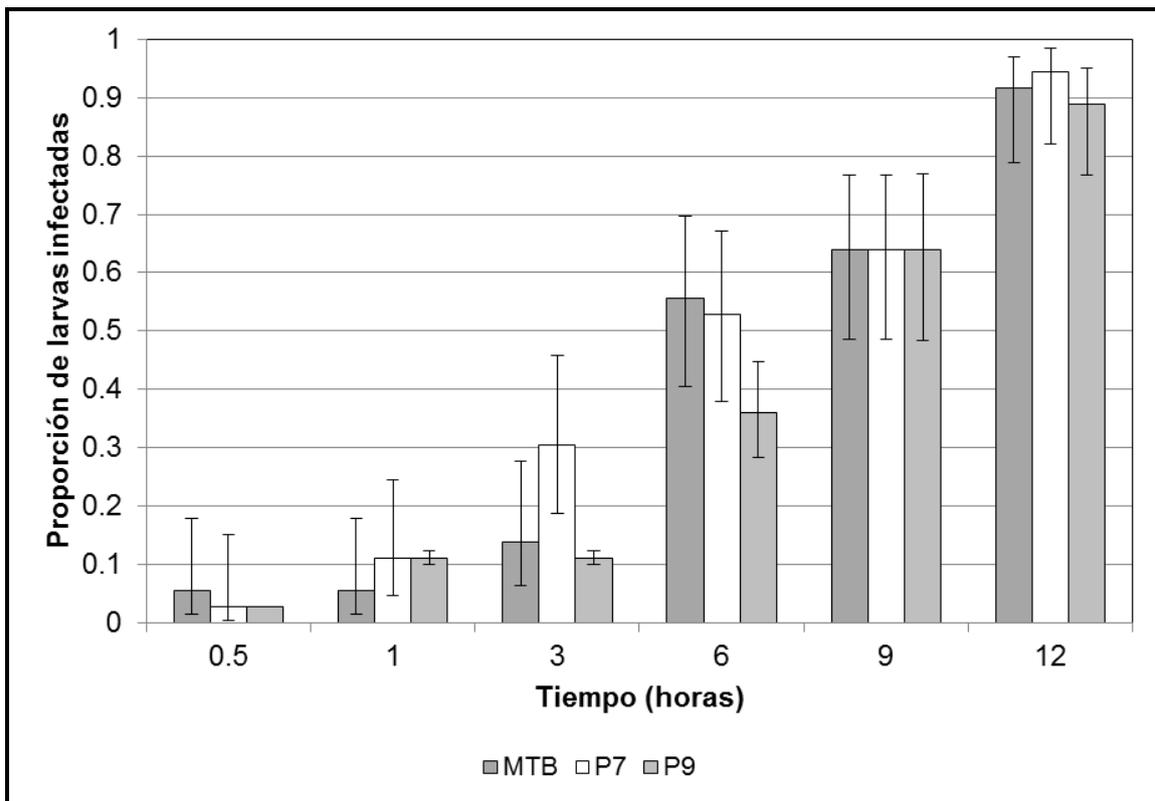


Figura 15. Proporción de larvas de *Diatraea saccharalis* infectadas por cada uno de los aislamientos a diferentes tiempos de exposición. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95% transformado de la escala logística.

4.2.3. CAPACIDAD DE PENETRACIÓN

No se encontraron diferencias significativas en el número de nematodos por aislamiento que penetraron en las larvas de *D. saccharalis* ($F_{2,105} = 2.19$, $P=0.117$). Los tres aislamientos tienen la misma capacidad de invadir (penetrar) a la larva de *D. saccharalis* (Figura 16).

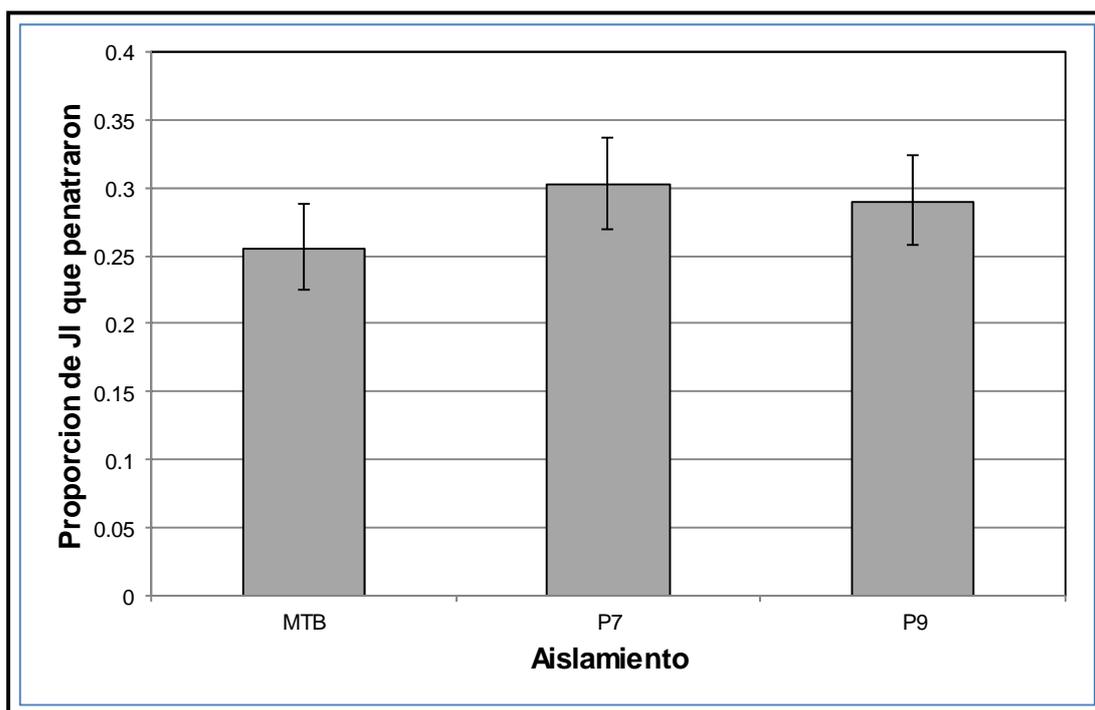


Figura 16. Proporción de JI de cada aislamiento que penetraron en larvas de *D. saccharalis*. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95% transformado de la escala logística.

4.2.4. EFICIENCIA DEL USO DEL HOSPEDEDANTE

Se encontraron diferencias significativas en la producción de JI en larvas de *D. saccharalis* entre los tres aislamientos de nematodos ($F_{2, 104} = 4.15$, $P= 0.018$). El aislamiento MTB es

el que mayor número de JI produjo seguido por P9 y el que menos JI produjo fue el aislamiento P7 (Figura 17).

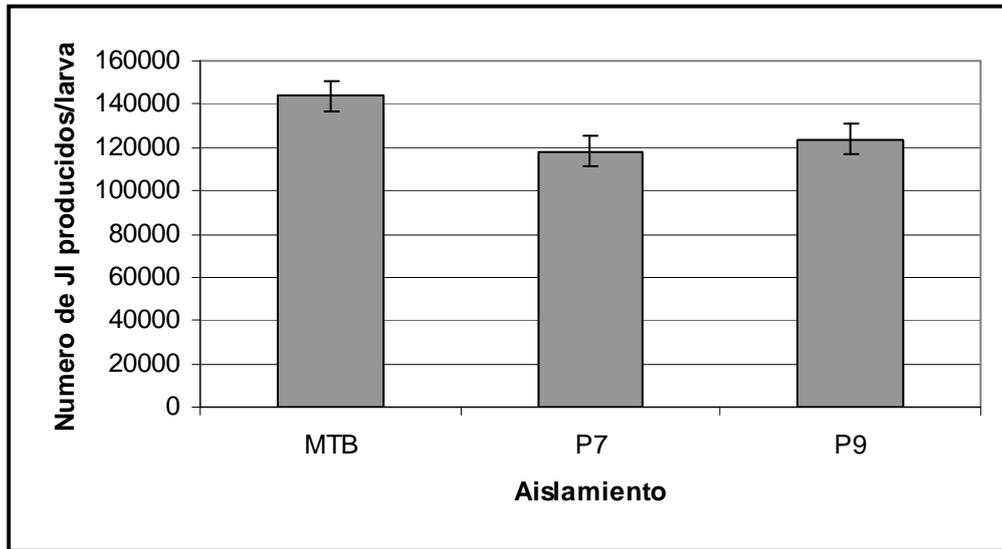


Figura 17. Cantidad promedio de JI producidos por cada aislamiento por larva. Las barras de error representan $\pm 1X$ EEM (Error Estándar de la Media) ($gl = 69$).

4.3. DISCUSIÓN

En este estudio se comparó la variación entre tres aislados de *Steinernema* sp colectadas en aéreas cañeras del Municipio Paso del Macho, Veracruz basados en propiedades biológicas como virulencia, tiempo de exposición requerido para matar al insecto hospedero, capacidad de penetración y capacidad de uso del hospedero, que pudiesen ayudarnos a separar los aislados bajo estudio. Las diferencias en virulencia entre los tres aislados fueron relativamente bajas, ocasionando el 50% de mortalidad a larvas de *D. saccharalis* con dosis

de 2.9, 3.4 y 3.7. La comparación entre poblaciones de nematodos entomopatógenos en general ha demostrado que estos constituyen poblaciones genéticamente heterogéneas (Stuart *et al.*, 2004), sin embargo, *Steinernema* (MTB, P7, P9) colectadas en sitios vecinos del área de muestreo, se comportaron como una población genéticamente homogénea, con ligeras variaciones en su capacidad de invasión y reproductiva. La exposición 1 a 1 (una larva de *D. saccharalis* vs. un JI) produjo mortalidad desde las 48 h de exposición, en concentraciones relacionado con la virulencia y capacidad de penetración de los aislados MTB, P7, P9. La velocidad para matar estos aislados fue similar a lo reportado por Ricci *et al.*, (1996), quienes mencionan que concentraciones de 15 y 50 JI de *S. riobravis* y *S. feltiae* respectivamente, sobre larvas de *G. mellonella* es suficiente para causar el 100% de mortalidad; no siendo así para otras especies donde el 100% se alcanza con altas dosis. Resultados similares se presentan con concentraciones (6 en total) que van desde los 20 a 240 JI de *S. riobravis* contra *E. loftini* causando el 100% de mortalidad a los dos días de exposición (Legaspi *et al.*, 2002).

Los nematodos fueron capaces de invadir rápidamente a larvas de *D. saccharalis* (0.5 h), la mortalidad incrementó a través del tiempo, alcanzando el 100% a las 12 h de exposición (Figura 1). La virulencia y el tiempo requerido para matar pudo estar influenciado por varios factores; por ejemplo, número de JI invasores, y células liberadas de la bacteria simbiótica, *Xenorhabdus* que se encuentran en el intestino del nematodo (Steven *et al.*, 1992) y la velocidad para multiplicarse (Aydin y Susurluk, 2005); o por otra parte el comportamiento evasivo y agresivo de las larvas, que se relaciona con la capacidad de los JI para encontrar y penetrar al insecto hospedero, contribuyendo con el fracaso o éxito del parasitismo (Gaugler *et al.*, 1994).

Los NEP tienen capacidades diferentes de poder penetrar a diferentes hospederos. Sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias entre los tres aislados (Figura 2), donde la proporción de entrada fue de 25/100, 30/100 y 29/100 JI, para MTB, P9 y P7; respectivamente.

El aislado MTB tuvo una mayor capacidad de propagarse en larvas de *D. saccharalis* con un número de 144,452 JI, seguido de P9 con 123,743 y P7 con 117,995 JI. En experimentos de laboratorio con *S. riobarvis* presentó una progenie de 2,000 JI por larva del tercer instar de *E. loftini* con 10 nematodos como inóculo y alrededor de 4,000 JI al ser inoculado con 120 nematodos en cajas de Petri (Legaspi *et al.*, 2002). La capacidad de propagación puede relacionarse con el tamaño del hospedante (Puza y Mrácek, 2005), la eficiencia de la invasión, el tiempo de exposición y la concentración de los JI (Epsky y Capinera, 1993), así como la temperatura óptima (Parwinder *et al.*, 1994), la que también influye así mismo en la óptima reproducción para algunas especies, donde la adaptación térmica resulta de acuerdo en la especialización del hospedante.

Mediante los bioensayos realizados (23-25°C) se demostró que no existe variación entre aislamientos; con excepción de la prueba de eficiencia de uso del insecto hospedante en donde el aislado MTB fue capaz de producir mayor cantidad de JI por larva. La producción de JI está influenciado por la infectividad y la subsecuente mortalidad de las larvas; donde con la exposición de 1 JI/larva se obtuvo penetración y liberación de la bacteria simbiote causando la muerte de su hospedante (Converse y Miller, 1999), con concentraciones arriba de los 30 JI/larva se alcanzaron valores del 90% de mortalidad en los tres aislamientos, lo cual se infiere que a dosis más elevadas de 30 JI la virulencia será constante.

La velocidad para matar observada en los tres aislados es similar a la mencionada para muchas otras especies de Steinernematidos (Grewal *et al.*, 1994; Koppenhofer y Kaya, 1999). La poca variabilidad observada entre aislamientos puede estar relacionada con el origen geográfico de estos, ya que proceden de aéreas geográficamente cercanas que han sido plantadas con caña de azúcar durante varios ciclos de cultivo y que pertenece a la misma franja de clima caliente, clasificada por parte del Ingenio Central Progreso.

La separación geográfica de los nematodos y su adaptación hacia un hospedante en específico se han dirigido hacia una adaptación adaptativa, y esto a su vez a una formación de nuevas especies y razas (Gaugler y Kaya, 1990; Stock, 2002). La búsqueda de los nematodos hacia su hospedero podría concentrarse en la selección hacia ciertos insectos y por tanto su localización física a través del suelo serviría como una clave selectiva para la localización de su hospedero. Estos nematodos pueden estar en un futuro adaptados y ser activos a temperaturas y niveles de humedad tal que podrían soportar su hospedante, para poder sobrevivir y moverse en un particular tipo de suelo, incluso para evitar a sus depredadores (Gaugler y Kaya, 1990).

Los estudios taxonómicos realizados en esta misma investigación (capítulos 2 y 3) mostraron que dichos aislamientos presentaron características morfológicas y moleculares similares, por lo que se puede considerar que se trata de la misma especie adaptada a condiciones tropicales con potencial de reducir poblaciones del barrenador de la caña de azúcar. Sin embargo, es necesario realizar estudios de entrecruzamiento entre aislamientos y descartar la posibilidad de que se trate de diferentes especies o ecotipos.

4.4. LITERATURA CITADA

Aydin, H. y A. Susurluk. 2005. Competitive abilities of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the same host at different temperatures. Turkish Journal of Biology 29, 35-39.

Caroli, L., I. Glazer., y R. Gaugler, 1996. Entomopathogenic nematode infectivity assay: comparison of penetration rate into different hosts. Biocontrol Science and Technology 6, 227-23.

Converse, V. y R. W. Millar. 1999. Development of the One-on-One Quality Assessment Assay for Entomopathogenic Nematodes. Journal of Invertebrate Pathology; 74, 143–148.

Epsky D., Nancy y L., John, Capinera. 1993. Quantification of Invasion of Two Strains of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) into Three Lepidopteran Larvae. Journal of Nematology 25:2, 173-180.

Gaugler R. y H. K. Kaya, 1990. Entomopathogenic nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL. USA. ISBN 0-8493-4541-3. PP 53.

Georgis, R., y S. A. Manweiler. 1994. Entomopathogenic nematodes: A developing biological control technology. Agricultural Zoology Reviews 6: 63-94.

Gaugler, R., Y. Wang, y Campbell, James F. 1994. Aggressive and Evasive Behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvae Defenses Against Entomopathogenic Nematode Attack. *Journal of Invertebrate Pathology* 64, 193-199.

Glazer, I. y Lewis, E.E. 2000: Bioassays for entomopathogenic nematodes. *En: Bioassays for entomopathogenic microbes and nematodes*. Pp. 229-247. Navon, A. y Ascher, K.R.S. (eds) CAB International.

Grewal, P.S., S. Selvan., y R. Gaugler 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes. Niche breadth for infection, establishment end reproduction. *Journal Thermal Biology* 19: 4, 245-253.

Hominick W.M., A. P.Reid, 1990. Perspectives on entomopathogenic nematology. Pp 327-343. *En Entomopathogenic nematodes in Biological Control* (Gaugler R., y Kaya H. K., Eds).CRC Press, Boca Raton, FL. USA.

Koppenhofer A.M. y H. K. Kaya. 1999. Ecological characterization of *Steinernema rarum*. *Journal, Invertebrate Pathology*. 73: 120-128.

Legaspi C. J., B. C. Legaspi Jr. y R. R. Saldaña. 2002. Evaluation of *Steinernema riobravis* (Nematoda: Steinernematidae) against the mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal Entomological Science* 35: 2.

Parwinder S. Grewal, Sen Selvan y Randy Gaugler. 1994. Thermal Adaptation of Entomopathogenic Nematodes: Niche Breadth for Infection, Establishment, and reproduction. *Journal Thermal Biology* 19: 4, 245-253.

Payne RW., D.A. Murray., S.A.Harding., D.B. Baird y D.M.Soutar, 2005. GenStat for Windows (8th Edition) Introduction. VSN International, Hemel Hempstead.

Puza Vladimír y Mráček Zdenek. 2005. Seasonal dynamics of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as a response to abiotic factors and abundance of insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 116-122.

Ricci, M., I. Glazer, J. F. Campbell y R. Gaugler. 1996. Comparison of Bioassays to Measure Virulence of Different Entomopathogenic Nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 6: 235-245.

Stevens R. Sims, Amy S. Downing y Jay C. Pershing. 1992. Comparison of Assays for the Determination of Entomogenous Nematode Infectivity. *Journal of Nematology* 24 :2, 271-274.

Stock, S. Patricia. 2002. *New Trends in Entomopathogenic Nematode Systematics: Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction*. Vancouver, Canada; the Tenth International Congress of Parasitology.

Susurluk A.I. y Ralf- Udo Ehlers. 2008. Comparison of some characterizations of recovery from soil and newly fermented Entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditidae; Heterorhabditidae). *Journal of Environmental Biology* 2: 6, 65-71

White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode from cultures. *Science* 66, 302-303.

Woodring L. Jennifer y H.K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Fayetteville, Arkansas, USA. pag. 1-29.

5.0. CONCLUSIÓN GENERAL

La necesidad de encontrar nuevas especies de nematodos entomopatógenos lleva consigo la necesidad de trabajar en cuestiones taxonómicas con apoyo en microscopia de luz, microscopia de barrido, y las herramientas de vanguardia como biología molecular. Mediante los estudios de morfología y morfometría se logró determinar que no existen diferencias entre los tres aislados (MTB, P7 y P9) colectados en Veracruz, por lo que se consideró que pertenecen a una misma especie, lo que se corroboró mediante estudios filogenéticos y moleculares. Tomando en cuenta los resultados se decidió nombrar al conjunto de aislados como *Steinernema* sp (MTP-7-9).

La especie bajo estudio fue ubicada en el grupo IV, donde la característica principal de este grupo es la presencia de “tipo cuernos” en la región anterior de los JI, característica que también está presente en la especie bajo estudio. No obstante la mayor cercanía taxonómica de *Steinernema* sp (MTP-7-9) la tuvo con *S. riobrave* en los estudios morfométricos, tales como el largo de los JI 591.7µm y 622.0µm; el largo de los machos de primera generación con 1753.4µm y 1700µm de *Steinernema* sp (MTP-7-9) y *S. riobrave* respectivamente. Teniendo también una similitud morfológica con *S. riobrave* con respecto al número de papilas genitales de los machos, pero no la misma distribución, ya que *S. riobrave* presenta una papila cerca de la base de las espículas la que está ausente en *Steinernema* sp (MTP-7-9). En los estudios moleculares realizados se presentan 8 diferencias en el número de nucleótidos en la región conservada (5.8S), y mediante estudios de matriz de estimación de divergencias fue posible la separación de *S. bicornutum* con *S. ceratophorum* con un 4.0%, teniendo un 93.0% de separación de *Steinernema* sp (MTP-7-9) con respecto a *S. riobrave*.

Los estudios realizados no permiten separar a *Steinernema* sp (MTP-7-9) de *S. riobave* por lo que se considera necesario analizar más regiones del ADNr como son el 28S, D2/D3 que se consideran regiones más específicas, para poder corroborar su identidad como especie nueva o como *S. riobave* obtenida de una nueva localidad.

Una de las características importantes de los nematodos entomopatógenos es su capacidad para matar a su hospedante, el tiempo en que lo realiza y el número de nematodos necesarios para lograrlo. Los tres aislados tuvieron atributos similares con respecto a pruebas de efectividad biológica realizadas en condiciones de laboratorio sobre *D. saccharalis*, solamente el aislado MTB presentó variación en la capacidad de propagación de los JI; esto comprueba los resultados obtenidos en los estudios de morfología, morfometría y molecular (ITS), que pone a los tres aislados como la misma especie.